

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Geneviève D U R A N D

ISOLEMENT D'UNE PROTEINE SERIQUE
CAPABLE DE DIMINUER L'ACTIVITE BIOLOGIQUE
DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE

Soutenue le 1er Octobre 1970

JURY : MM. J.E.COURTOIS
J.L.PARROT
Y. COHEN
J. AGNERAY

Président

Examineurs

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Geneviève D U R A N D

ISOLEMENT D'UNE PROTEINE SERIQUE
CAPABLE DE DIMINUER L'ACTIVITE BIOLOGIQUE
DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE

Soutenue le 1er Octobre 1970

JURY : MM. J.E.COURTOIS
J.L.PARROT
Y. COHEN
J. AGNERAY

Président

Examineurs

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'Etat)

par

Généraliste DURAND



ISOLEMENT D'UNE PROTEINE SERIQUE
CAPABLE DE DIMINUER L'ACTIVITE BIOLOGIQUE
DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE

Soutenue le 1er Octobre 1970

Président	JURY : MM. J.E. COURTOIS
Examineurs	J.L. PARROT
	J. CORREY
	J. AGNERAY

PERSONNEL

E L A F A C U L T E D E P H A R M A C I E D E P A R I S

ADMINISTRATION

M. MALANGEAU P.		DOYEN
M. GUILLOT M.	O + ...	Assesseur
M. DELAVEAU P.		Assesseur
M. RODINEAU L.	+	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.		Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M. BRENN A.	+	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M. TRICAN J.N.		Attaché Principal d'Administration Universitaire
M. JEANDEL L.		Attaché d'Administration Universitaire
Mme ESPINASSE M.L.		Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB	+	Attaché d'Administration Universitaire
Mme MUR A.M.		Attaché d'Administration Universitaire
Melle FRIZOL E.		Attaché d'Administration Universitaire

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L. O +
M. FLEURY P. O +
M. PICON M. O +

PROFESSEURS

M. JANOT M.M.	O +	Membre de l'Institut ...	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G.	O +		Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R.	O +		Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M.	O +		Physique (T)
M. GAUTIER J.A.	O +		Chimie Organique (T)
Melle LAMBIN S.	+		Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+		Physiologie (T)
M. COURTOIS J.	+		Chimie Biologique (T)
M. DOMANGE L.	O +		Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R.	O +	Membre de l'Institut ...	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A.	+		Hydrologie (T)
M. CAVIER R.	+		Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A.	A. +		Hygiène et Education Sanitaire (T)
M. MOREAU R.	+		Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.			Microbiologie
M. PIETTE M.	+		Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.			Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M.	+		Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMANN G.			Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G.	+		Botanique (T)
M. FLAHAUT J.			Minéralogie (T)
M. RENAULT J.			Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.			Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.			Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. LARUELLE P.			Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.			Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.			Pharmacie Galénique Industrielle (T)
M. DELAVEAU P.			Séméiologie et Pathologie Générale (T)
M. COHEN Y.			Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.			Physique
M. BOURDON R.			Chimie Analytique
M. REYNAUD P.			Pharmacie Chimique
M. LE MOAN R.			Toxicologie
M. POISSON J.			Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.			Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.			Hématologie
M. PERCHERON F.			Chimie Biologique
M. SAVEL J.			Biologie Animale
M. DESVIGNES A.			Cryptogamie et Technique Bactériologique
M. MIOCQUE M.			Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.	Toxicologie
M. BORY J.	Microbiologie
M. GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
M. GOUNELLE J.C.	Physiologie
M. BINET P.	Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C.	Chimie Organique
M. PLAT M.	Chimie Analytique
Mme PLAT M.	Législation et Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
M. CAVE A.	Matière Médicale
M. PUISIEUX F.	Pharmacie Galénique
M. DUCHON D'ENGENIERES M.	Chimie Organique
M. ADOLPHE C.	Physique
M. GUERNET M.	Chimie Analytique
M. DIDRY J.	Mathématiques appliquées aux Sciences Expérimentales
M. KHODADAD P.	Chimie Minérale
M. PERLES R.	Chimie Biologique
M. LEMONNIER A.	Biochimie Appliquée
M. YONGER J.	Chimie Analytique
M. HAMON M.	Chimie Analytique
M. MESTRE J.	Botanique
M. AGNERAY J.	Biologie
M. DREUX C.	Biochimie Appliquée
M. RIVET J.	Chimie Générale et Minérale
M. ETIENNE J.	Mathématiques
M. HAZEBROUCQ G.	Physique
M. ROUSSELET F.	Chimie Analytique
M. BOURRINET P.	Hygiène
M. SOULEAU Ch.	Chimie Générale et Minérale
Mme HUBERT J. (délég.)	Microbiologie
Melle BOURNIQUE C. (délég.)	Botanique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P.	+
M. GUERIN H.	+
Mme HARISPE M.	
Melle LONGUEVALLE S.	
M. HARISPE	+

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANDRE Guy	dél.	TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
M. ADAM Yves	tit.	TP Pharmacie Chimique 5è A (Synthèse médicaments)
M. AYMARD Pierre	tit.	ED Physiologie - Histologie
Melle BARNIER Suzanne	dél.	Mathématiques
Melle BENOIS Martine	dél.	TP Botanique 2è A
Melle BERNARD Jacqueline	tit. ...	TP Bactériologie 5è A - Industrie
M. BESANCON Pierre	stag.	Mathématiques
Mme BLANC Jeanine	tit.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme BONALY Jacqueline	dél.	ED Botanique 1 A
Mme BOSIO A. Marie	dél.	TP Chimie Qualitative
M. BOURLIOUX Pierre	dél.	CES Bactériologie
M. BOY Pierre	dél.	Mathématiques
M. CAILLARD Claude	dél.	TP Pharmacodynamie 4 - 5 A
M. CANAL Jacques	dél.	ED et TP Biochimie Appliquée 5 A
M. CARRE Daniel	dél.	Mathématiques
Melle CARRERE Clotilde	tit.	TP Microbiologie 4 A
M. CEOLIN René	dél.	ED Chimie Minérale 1 A
Mme CENAC Jacqueline	tit.	CES Parasitologie
Mme CHARDENOT Paulette	tit.	Chimie Biologique 3 - 4 A
Mme CHARPENTIER Madeleine	tit. ..	ED Chimie Générale et Minérale 1 A
M. CHERON Jean-Marie	dél.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
Melle CLAIR Geneviève	tit.	ED Matière Médicale 3 - 5 A
M. DAGRON Christian	tit.	ED Chimie Générale et Minérale 2 A
M. DAVY Jean	dél.	CES Biochimie
Melle DECAUDIN M. Thérèse	tit. ..	TP Parasitologie 4 A
M. DELATTRE Jacques	dél.	DEPS Exploitation Biochimique
M. DELCOURT Alain	dél.	ED Botanique 2 A
M. DOUSSIN Alexandre	tit.	TP Chimie Analytique 5 A
Melle DUCHENE Dominique	dél.	CES Pharmacie Galénique Industrielle
Melle DUMANT Geneviève	tit.	CES Analyse physico-chimique des médicaments
Mme DUPONT Charlotte	tit.	CES Pharmacodynamie
M. ETIENNE Guy	tit.	TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
Mme FAURE Liliane	stag.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Melle FLEURY Solange	tit.	ED Chimie Analytique Quantitative
Melle FOGLIETTI M. José	tit.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. GAIRARD Alexis	dél.	CES Contrôle médicaments (Biologie)
M. GAYRAL Philippe	dél.	TP Zoologie 1 A
Melle GERMAN Françoise	dél.	Mathématiques
M. GIRARDEAU J. François	dél. ...	TP Chimie Organique 5 A (Synthèse Organique)
M. GOBERT Jean	stag.	TP Zoologie 1 A
Melle GOURSAT M. José	tit.	ED Botanique 1 A
M. GROSSIORD J. Louis	dél.	TP Physique 1 A
Melle GUILLOUX Edith	dél.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. HENRY Jacques	tit.	Essais médicaments chimiques et galéniques

M. JULIEN Maud	tit.	ED Physique 2 A
M. JULIEN René	tit.	ED Chimie Minérale 1 A
Mlle JUND Yvonne	tit.	CES Microbiologie et contrôle médicaments Microbiologie
M. LALEGERIE Pierre	stag.	CES Biochimie
M. LAROCHE Jacques	tit.	TP 5 A - Secourisme - Hygiène - Education Sanitaire
Mme LEDUC Yvette	tit.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEGENDRE Lucien	dél.	TP Chimie Organique 2 A
Mme LEGER Nicole	tit.	Parasitologie 5 A
M. LELUC Robert	tit.	CES Bactériologie
M. LEMAY René	tit.	CES Législation
M. LEPAREUR Christian	dél.	Mathématiques
Mme LE QUANG THUAN	stag.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEVILLAIN Pierre	tit.	ED Chimie Analytique Qualitative
Mme LEVY Françoise	dél.	ED Botanique 2 A
M. LIKFORMAN Joseph	tit.	ED Physique 1 A
Mlle LONGEVIALLE Monique	tit. ..	ED Botanique 1 A
M. MAHUZIER Georges	tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
M. MANDEREAU Jean	tit.	CES Pharmacotechnie Chimique
M. MANET Léon	stag.	CES Biochimie
M. MARTIN-FRERE Henri	tit.	TP Chimie Générale et Minérale 1 A
M. MAUGUEN Yves	dél.	Mathématiques
Mme MAYRARGUE Joëlle	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mlle MICHELET Annick	tit.	ED Chimie Générale et Minérale 2 A
M. MOULIN Pierre	dél.	TP Physique 1 A
Mme MOURY Jacqueline	stag.	TP Zoologie 1 A
Mme NOTTEGHEM M. Jacqueline	tit.	ED Parasitologie 4 A
M. NGUYEN Phu Lich	dél.	CES Toxicologie
Mme PANOUSE Jacqueline	tit.	CES Microbiologie - Virologie - Immunologie
Mme PAOLAGGI Françoise	stag.	CES Electrochimie (Biochimie Appliquée)
M. PESTIS Jean	tit.	TP Anatomie, Physiologie Humaine
Mme PIETTE Colette	tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POUILLAIN Pierre	tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POUSSET J. Louis	tit.	TP Chimie Extractive 5 A
M. QUENEZ Pierre	tit.	TP Chimie Générale et Minérale 1 A
Mme RABIAN Odile	dél.	ED Chimie Analytique Qualitative
M. RABARON Alain	dél.	CES Pharmacotechnie Galénique
Mme ROBERT Monique	tit.	CES Immunologie - Microbiologie
M. RODIER Noël	dél.	ED Physique 2 A
Mlle ROLLEN Alice	tit.	TP Botanique 1 A
Mlle ROUSSELET Renée	tit.	Essais médicaments végétaux
Mme RUDLER Michèle	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme SALES Nicole	stag.	TP Physiologie, Histologie
Mlle SEBASTIEN Francine	dél. ...	TP Microbiologie 5 A (Biologie Officine)
M. SCHUSTER Jean	tit.	Essais des médicaments chimiques et galéniques
Mlle SORIA Claudine	stag.	Biologie Officine 5 A
Mme SEILLER Monique	tit.	TP Pharmacie Galénique Industrielle

Melle STRUPLER Nicole	tit.	ED	Chimie Générale et Minérale 1 A
M. TOUBOUL J. Pierre	dél.	TP	Chimie Analytique 5è A
M. TRIEU Thuong Cong	tit.	TP	Chimie Analytique Quantitative
Melle TROUPEL Solange	stag.	TP	Chimie Analytique Quantitative
Mme VAN AMERONGEN Geneviève	dél.	ED	Chimie Analytique Quantitative
M. VAYSSIERE J. Michel	dél.	ED	Chimie Organique 1 - 2 A
M. VILLERS Jacques	tit.	TP	Physique 2 A
Mme WELBY Josette	dél.	TP	Pharmacie Galénique

BIBLIOTHEQUE

Melle RUYSEN Y.	+	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.		Conservateur
Mme COULFT M.A.		Conservateur
Melle LANGLOIS C.		Conservateur
N...		Conservateur

Légion d'honneur	(+	Chevalier
	) 0	Officier
	(C	Commandeur

A Monsieur le Professeur Jean-Emile COURTOIS

qui a suivi ce travail avec une vigilance non démentie,
empreinte de rigueur et de sollicitude et qui m'a fait
l'honneur d'accepter de présider le Jury.

Hommage de profonde et respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean-Louis PARROT

qui est à l'origine de cette thèse et dont les travaux
en ont rendu la réalisation possible.

En témoignage de ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Yves COHEN

qui a bien voulu apporter à ce travail de biochimie
l'intérêt du pharmacologiste.

En témoignage de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean AGNERAY

dont je suis l'élève depuis plus de cinq ans,
qui, par son exemple et ses conseils m'a donné le
goût de la recherche et a suivi mes expériences avec
une amicale exigence.

En témoignage de sincère attachement et de profonde
reconnaissance.

A Monsieur Bernard LEBEL

Sa thèse et la mienne ont bénéficié d'un canevas commun
où se sont nouées nos expériences et notre amitié.

A Madame Jeanne FEGER

qui retrouvera dans ce travail bien des idées qui sont
les siennes.

A mes Amis de l'Internat et du laboratoire central de Chimie
Biologique de l'Hôpital HEROLD

A toutes celles et tous ceux qui m'ont aidée à réaliser ce travail.

A mes parents

pour ce qu'ils m'ont transmis, pour ce qu'ils m'ont donné,
pour l'affection et la confiance dont ils m'ont toujours
entourée.

A Dominique DURAND

J'ai trouvé à son côté le climat de sérénité et d'assurance
qui m'a permis de mener mes expériences jusqu'à cette étape.

A mon fils Benoît

dont le sourire doit apparaître, ici et là, en filigrane
entre ces lignes souvent austères.

Meis et amicis.

I N T R O D U C T I O N

=====

L'Histamine fait contracter la plupart des muscles lisses chez de nombreuses espèces de Poissons, d'Oiseaux et de Mammifères, mais son action varie grandement selon l'organe et l'espèce.

Les muscles lisses du Cobaye sont particulièrement sensibles. Ainsi la bronchoconstriction avec dyspnée expiratoire est le signe capital de l'intoxication histaminique aiguë chez cet animal. C'est également la grande sensibilité de l'iléon isolé de Cobaye qui est mise à profit pour le dosage biologique de l'histamine sur l'organe isolé.

PARROT et ses collaborateurs (74) ont montré que certains sérums humains sont capables de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Ils identifient le facteur responsable à une protéine qui est absente ou inactive dans le sérum de l'Homme allergique.

Le travail exposé dans cette thèse consiste en l'isolement de cette protéine sérique capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. A chaque étape de fractionnement, l'enrichissement de la préparation en facteur étudié est apprécié par le seul test pharmacologique. Ce travail résulte d'une étroite collaboration entre une équipe de biochimistes et un groupe de pharmacologistes; l'étude pharmacologique a été faite par LEBEL (53) dans le cadre de sa propre thèse. Dans une deuxième partie, nous précisons la nature du phénomène. Est-il purement pharmacologique ou résulte-t-il d'une combinaison préalable d'une protéine sérique et de l'histamine ?

En effet, il peut s'agir d'un phénomène pharmacologique, la protéine sérique masquant partiellement les récepteurs de l'iléon. Il peut y avoir également inactivation d'une partie de l'histamine par suite de la formation d'un complexe inactif avec la protéine; seule l'histamine restée libre dans le milieu provoque alors la contraction de l'iléon de Cobaye.

Dans ce cas, il faut admettre que cette protéine joue un rôle physiologique et permet en partie l'inactivation de l'histamine libérée dans la circulation sanguine.

Il existe deux processus généraux d'inactivation :

- 1°) l'histamine peut subir une transformation chimique qui aboutit à des corps inactifs ou moins actifs. Pour juger

de cette histaminolyse, il faut connaître les diverses voies métaboliques de l'histamine chez l'Homme.

2^e) l'histamine peut être retenue par de grosses molécules et empêchée, de cette manière, d'exercer son action. C'est ce que PARROT appelle histaminopexie (62).

Il est bon avant d'entreprendre l'exposé de ce travail de rappeler le devenir chez l'Homme de l'histamine d'origines exogène et endogène.

P R E M I E R E P A R T I E

=====

E T U D E T H E O R I Q U E

=====

C H A P I T R E I

=====

HISTAMINE D'ORIGINE EXOGENE

A/ ORIGINE

L'histamine présente dans le tube digestif résulte de la décarboxylation de l'histidine par les bactéries de la flore intestinale. Une part très faible est absorbée sous forme libre. La plus grande partie se trouve soit détruite, soit retenue dans l'intestin.

B/ CATABOLISME

L'histamine est inactivée dans le tube digestif par acétylation de la fonction aminée de la chaîne latérale (TABOR et MOSETTIG, 93). L'acétylhistamine passe dans la circulation

sanguine et est excrétée par le rein. C'est l'histamine conjuguée des urines dont le taux est augmenté par un régime carné.

C/ CAPTATION DE L'HISTAMINE PAR LA MUCINE

Il existe, d'autre part, un mécanisme qui retient l'histamine dans l'intestin, c'est sa captation par la mucine.

La recherche d'un facteur de captation de l'histamine exogène a eu pour point de départ l'observation clinique d'intoxications consécutives à l'ingestion de poissons (LEGROUX et coll.,55 - BOYER et coll.,17). La présence d'une quantité importante d'histamine dans ces aliments avariés et la suppression des manifestations toxiques par un antagoniste de l'histamine comme le néoantergan, sont la preuve du rôle pathogène joué par cette amine.

Les diamines, comme la putrescine, la spermine, la cadavérine qui accompagnent toujours l'histamine dans les processus de putréfaction, interviennent également en levant un obstacle qui s'oppose normalement au passage de l'histamine à travers l'intestin. En effet, les expériences des pharmacologistes semblent contredire les données des cliniciens puisqu'on constate que l'homme tolère des doses importantes d'histamine per os, de 200 à 500mg au moins sans modifications du pouls ni de la pression artérielle.

L'étude toxicologique permet de préciser un certain nombre de points importants. PARROT et coll. (67) remarquent que des doses d'histamine et de putrescine, très inférieures aux doses mortelles lorsque ces substances sont administrées seules, entraînent la mort des animaux par leur association. De même, on observe une élévation du taux d'histamine dans le sang pour une dose de cette substance qui seule ne provoque aucune histaminémie. Les recherches sont alors poursuivies sur cet organe isolé. Après avoir introduit une solution d'histamine dans une anse de l'intestin grêle de cobaye, PARROT (62), puis DWORETSKY et CODE (33) constatent un certain temps de latence avant son passage dans le milieu extérieur, comme si au préalable un substrat devait être saturé. L'action de la spermine se manifeste par la libération d'une certaine quantité d'histamine préalablement dissimulée. La diamine se comporte comme un compétiteur pour déplacer l'histamine fixée et non pour inhiber sa destruction.

Chez l'homme l'étude des sucs gastriques et intestinaux a conduit à des résultats identiques. Des méthodes physiques comme l'équilibre de dialyse (PARROT,63) et l'ultrafiltration (NEUGEBAUER,58) ont permis de préciser la nature du substrat et le mode d'action des diamines. Il s'agit de la mucine, complexe de nature glycoprotidique (JARDILLIER,46); celle-ci capte l'histamine et des diamines jusqu'à saturation de ses sites de liaison.

Lors d'intoxications, les diaminesaturent les sites de captation et l'histamine en excès passe dans le milieu intérieur en quantité suffisante pour provoquer des troubles.

COHEN (22), en utilisant une technique de perfusion vasculaire des anses intestinales du Rat, constate que l'intestin de l'animal s'oppose au passage de l'histamine dans la circulation. Il considère que ce phénomène est dû à la mucine libérée des cellules mucigènes détruites par la polyvinyl pyrrolidone contenue dans le liquide de perfusion.

C H A P I T R E I I

=====

HISTAMINE D'ORIGINE ENDOGENE

A/ BIOSYNTHESE

L'histamine endogène est vraisemblablement formée "in situ" par décarboxylation de l'histidine. Longtemps, on a considéré l'histamine comme une vitamine (GADDUM,35). Mais grâce à l'utilisation de l'histamine marquée au ^{14}C en position 2 du cycle imidazole, plusieurs auteurs (SCHAYER et COOPER,84) ont montré que l'histamine administrée oralement n'est pas stockée par les tissus humains. Depuis, la synthèse de l'histamine a été réalisée "in vitro" à partir de l'histidine radiomarquée en présence de divers tissus humains.

B/ LOCALISATION INTRACELLULAIRE

L'histamine tissulaire existe sous deux formes : l'une facilement accessible est présente dans la partie de la cellule extractible par l'eau, l'autre est localisée dans les granules. Cette fraction insoluble renferme l'histamine synthétisée in situ et quand tous ses sites de liaison sont occupés, l'histamine, formée ou captée en excès, demeure dans la partie soluble (GREEN, 39).

En effet, si après incubation avec de l'histamine non marquée, des cellules sont mises en contact avec de l'histamine marquée, on constate qu'une augmentation du taux d'histamine non marquée dans les granules entraîne une diminution de celui de l'histamine marquée.

L'existence de ces deux compartiments a été prouvée dans les mastocytes. C'est également à ce niveau qu'a été étudié le mode de liaison de l'histamine. Le mastocyte est, en effet, le lieu préférentiel de stockage et de synthèse de l'histamine. C'est essentiellement l'histamine présente dans les granules qui a fait l'objet de recherches.

La présence d'héparine dans les granules des mastocytes, de sulfomucopolysaccharides dans ceux des cellules cérébrales leur confère les propriétés d'un polymère échangeur d'ions, dans la mesure où ils ont plus les propriétés d'un gel que celles d'une solution. UVNAS (94) a d'ailleurs montré que la liaison de l'histamine est de type ionique, il constate que la libération de l'histamine des granules est due à un échange

entre celle-ci et le sodium du milieu extérieur, auquel il avait ajouté des traces de ^{22}Na .

Deux types de groupements peuvent contracter une liaison électrovalentielle avec l'histamine : les groupements sulfuriques de l'héparine et les groupements carboxyliques de l'héparine ou des protéides. UVNAS (94), étudiant en fonction du pH les courbes de fixation de sodium et de libération d'histamine, constate que ces deux phénomènes atteignent leur maximum à pH 7,0. Ceci implique au niveau des granules des mastocytes une liaison de l'histamine avec un groupement acide faible. Il faut noter que l'héparine est liée en partie par ses groupements sulfuriques aux restes arginine de la protéine. L'histamine est-elle liée aux groupements carboxyliques de l'héparine ou des protéines présentes dans les granules des mastocytes ? Aucune preuve, actuellement, ne permet de confirmer l'une ou l'autre hypothèse.

Des études entreprises, "in vivo", illustrent aussi ce mode de liaison. Des substances histamino-libératrices, tel le composé 48-80, produit de condensation de la p.méthoxy phénéthyl méthylamine et du formaldéhyde (PATON, 77) provoquent la dégranulation des mastocytes et la sortie de l'histamine dans le milieu intérieur. La présence d'ions sodium est indispensable à l'action de cette substance chimique. Dans un premier temps, le composé 48-80 provoque l'éclatement des granules et dans un deuxième temps, le sodium extracellulaire s'échange avec l'histamine qui est alors libérée.

C/ CATABOLISME

L'histamine libérée au cours d'un métabolisme normal ou dans des conditions pathologiques, subit une dégradation qui conduit à des corps inactifs ou moins actifs. L'importance relative de ses différentes voies métaboliques chez l'homme a été précisée par SCHAYER et COOPER (84). Après injection par voie intradermique d'histamine marquée sur le cycle imidazole il identifie les corps radioactifs présents dans l'urine.

Dans ces conditions, il trouve (Tableau I) :

- 2 à 3 p.100 d'histamine libre non métabolisée
- 4 à 5 p.100 de 1-4 méthylhistamine inactive

Cette méthylation a lieu essentiellement au niveau du poumon et du tissu rénal grâce à une enzyme l'imidazol N-méthyl transférase.

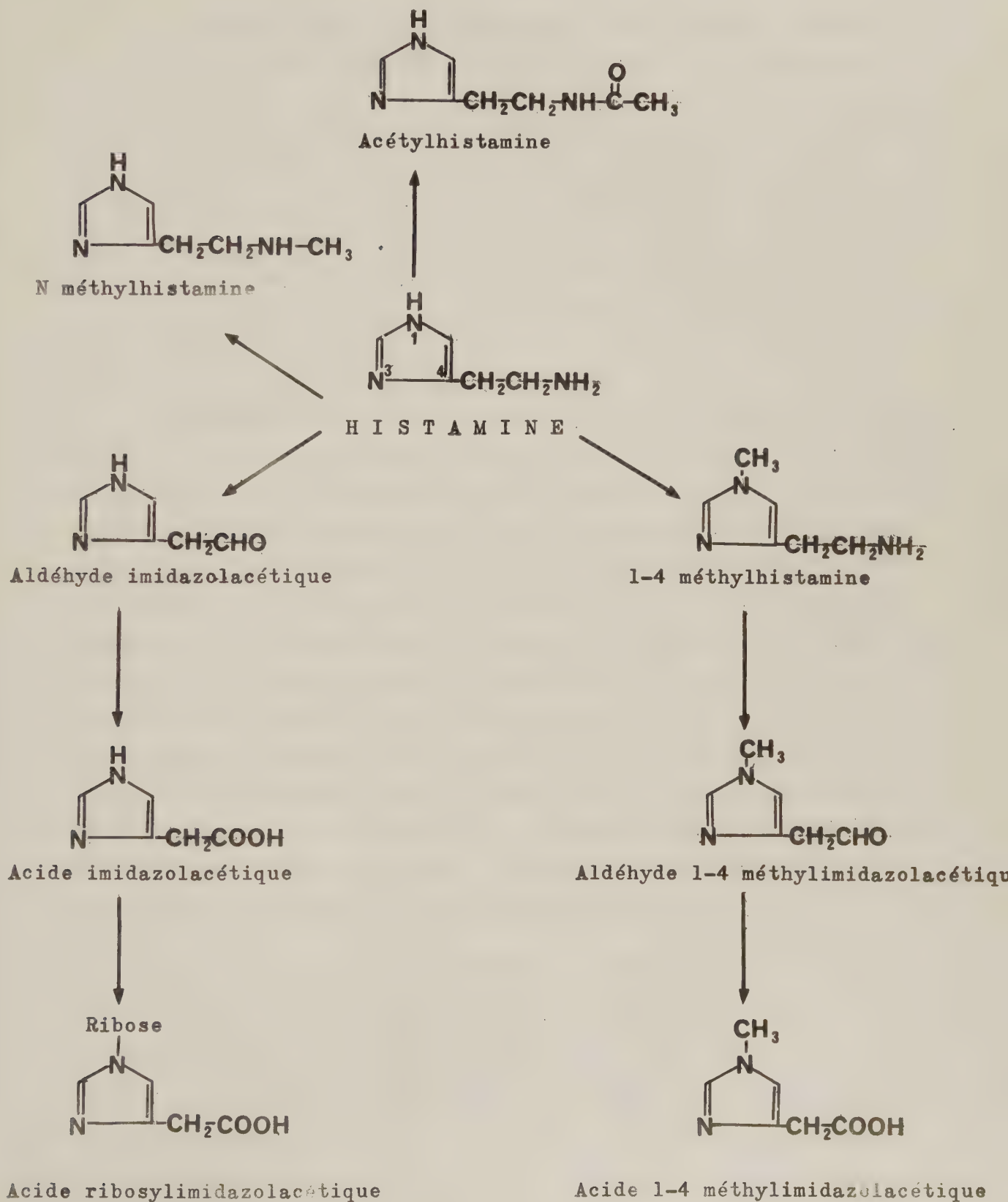
- 42 à 47 p.100 d'acide 1 méthyl imidazol acétique

La désamination oxydative du dérivé précédent est assurée par une monoamino oxydase.

- 9 à 11 p.100 d'acide imidazolacétique. L'histamine subit une désamination oxydative suivie d'une oxydation par l'histaminase ou diaminooxydase.

- 16 à 23 p.100 d'acide ribosylimidazol acétique
- 1 p.100 d'acétylhistamine.

TABLEAU I - CATABOLISME DE L'HISTAMINE



Il peut y avoir une méthylation de la chaîne latérale. Les composés alors obtenus sont aussi actifs que l'histamine.

Ces différentes voies métaboliques assurent en grande partie l'inactivation de l'histamine. Les enzymes assurant la dégradation de l'histamine sont absents de la circulation sanguine, à ce niveau donc l'histamine n'est pas catabolisée. Certains auteurs ont alors pensé que l'histamine pouvait être aussi inactivée par suite de sa combinaison avec une protéine plasmatique.

Cette hypothèse était avancée à la suite de la découverte du rôle joué par la mucine et par l'héparine dans l'inactivation de l'histamine d'origines exogène et endogène. Si le rôle de la mucine a été soupçonné lors d'observations cliniques au cours d'intoxications alimentaires et si le mode de liaison entre l'histamine et le complexe héparine-protéine a été prouvé au niveau même des mastocytes, il faut bien admettre que, dans le plasma on n'a jamais mis en évidence deux formes d'histamine : une libre et une liée. Ceci tient sans doute à la difficulté du dosage de l'histamine elle-même. Un taux de 10 à 140 µg par litre de sang reflète plus le taux cellulaire que le taux sérique. Mais les concentrations trouvées dans le sérum se sont révélées si variables suivant les techniques utilisées qu'il est difficile d'établir des valeurs normales.

4 ng à 8 ng/ml (d'après BARSOUM et SMIRK,7)

2 ng à 10 ng/ml (d'après BARSOUM et SMIRK,8)

1 ng à 5 ng/ml (d'après ANREP et coll.,6)

17 ng/ml (d'après PARROT et GABE,66)

La méthode fluorimétrique de SHORE, BURKHALTER et COHN (90) beaucoup plus spécifique et sensible pourrait peut-être résoudre ce problème. L'orthophtaldéhyde se combine à l'histamine en milieu fortement alcalin pour donner un produit qui, en milieu acide, a un spectre d'excitation à 360nm et un spectre d'émission à 450nm. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la concentration d'histamine entre 5ng et 500ng/ml.

Actuellement, l'existence d'un facteur sérique capable de fixer l'histamine n'est fondée que sur des expériences réalisées "in vitro".

A cette recherche d'un pouvoir de captation de l'histamine par le sérum, s'est ajouté un deuxième travail : l'étude différentielle des sérums des sujets normaux et allergiques.

Il existe, en effet, un rapport étroit entre le choc anaphylactique et le choc histaminique (DALE et LAIDLAW, 27). Les mêmes symptômes (augmentation de la perméabilité des capillaires, diminution de la pression artérielle, action contracturante sur le muscle lisse) sont observés dans les deux cas. La découverte des antihistaminiques de synthèse (BOVET et STAUB, 16), celle des rapports établis entre l'histamine et les mastocytes (RILEY, 83) et celle des substances histamino-libératrices ont permis de préciser les rôles physiologiques et physiopathologiques de l'histamine dans le choc anaphylactique. Il faut noter toutefois que les recherches concernant le rôle de l'histamine dans l'allergie humaine ont donné des résultats moins significatifs. Il semble que l'hypersensibilité humorale soit caractérisée par deux anomalies de l'équilibre biologique (PAUPE 78).

La première des ces anomalies réside dans le fait que certains individus synthétisent anormalement des anticorps vis-à-vis d'allergènes. Ces anticorps, récemment identifiés aux immunoglobulines E (ISHIZAKA,44) et l'allergène se fixent sur certains organes, sur les téguments, sur les plaquettes (ISHIZAKA et coll.,45).

La deuxième anomalie consiste en une altération des défenses naturelles vis-à-vis du complexe allergène-anticorps sur l'organe. Ce conflit libère des substances nocives (histamine, sérotonine, bradikynine) qui, chez l'individu normal, sont neutralisées par des défenses humorales. Le sujet allergique est impuissant à exercer cette protection. L'absence du pouvoir histaminopexique a représenté le premier diagnostic biologique proposé pour caractériser le terrain allergique.

C H A P I T R E I I I

=====

METHODES D'ETUDE DE L'HISTAMINOPEXIE SERIQUE

I- ETUDE DU POUVOIR DE CAPTATION DE L'HISTAMINE PAR UN SERUM HUMAIN NORMAL

A/ Technique physiologique

Les travaux de BENDA et URQUIA ont conduit à une différenciation des sujets normaux et allergiques par l'étude de l'action de leurs sérums injectés au Cobaye. Une seule injection sous-cutanée de 2ml de sérum humain normal à un cobaye augmente la résistance de l'animal à l'histamine : la dose létale 50 est doublée (11); le temps de passage d'aérosol nécessaire pour provoquer le bronchospasme passe en moyenne de 200 secondes à plus de 15 minutes (12).

Le sérum d'un sujet asthmatique est par contre dépourvu de cet effet protecteur (13).

Cette protection est progressive, de longue durée et transmissible de Cobaye à Cobaye. BENDA et URQUIA ont exploité ces données dans un but thérapeutique. L'injection de sérum humain normal à des sujets allergiques permet d'atténuer et même de supprimer les crises d'asthme de ces malades (10). Ils ont également appliqué ces résultats au diagnostic biologique de l'asthme. Mais ce test "in vivo" est difficile à utiliser en routine. Différents auteurs se sont alors attachés à étudier "in vitro" le pouvoir de captation de l'histamine par un sérum.

B/ Technique pharmacologique

PARROT et ses collaborateurs (74) ont, les premiers, et par une méthode pharmacologique, prouvé que le sérum humain normal est capable de fixer "in vitro" une partie de l'histamine qui lui est ajoutée.

Sur l'iléon de Cobaye, on compare les contractions déclenchées par un mélange contenant l'histamine à la même concentration et le sérum dilué au 1/20^e. Quand le sérum provient d'un sujet normal, on constate qu'une partie de l'histamine est devenue incapable d'agir sur le test biologique.

La présence de sérum d'un malade allergique ne modifie pas l'action contracturante de l'histamine (LABORDE et coll., 52). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'histamine

fixée dans des conditions techniques bien définies. Ainsi le pouvoir histaminopexique d'un sérum humain normal est de 20 p.100 en moyenne alors que celui d'un sérum d'asthmatique **est** nul. Le nombre de déterminations effectuées dans le domaine de la routine et de la recherche se chiffre par dizaine de mille (PARROT et coll.,69).

L'étude de la cinétique de la réaction a montré que la diminution de l'activité biologique de l'histamine en présence de sérum humain normal est immédiate et stable pendant huit heures. Le rôle de l'histaminase est donc exclu car son action augmenterait avec le temps. De plus, après avoir dosé l'histamine par la méthode de BARSUM modifiée par CODE (20), on constate que l'addition de sérum ne s'accompagne d'aucune perte d'histamine. Enfin, l'addition d'une diamine telle que la putrescine au milieu fait réapparaître une partie de l'activité de l'histamine. La putrescine agit comme compétiteur de l'histamine sur le substrat de captation du sérum normal (BURTIN-LABORDE,18). Ce phénomène pharmacodynamique a été reproduit par de nombreux auteurs : DANELATOS (28) - PELLERAT et coll. (80) - JEUNE et coll.(47) - HURIEZ et coll. (43). Par contre, il n'est pas retrouvé par d'autres : CRAPS et INDERBITZIN (25) - PAUTRIZEL (79). Il est certain que ce test biologique doit être réalisé dans des conditions opératoires rigoureuses. Ainsi une dialyse préalable est indispensable pour éliminer des substances qui pourraient avoir une action propre sur l'iléon isolé de Cobaye.

Enfin, d'autres auteurs, s'ils observent une captation de l'histamine par le sérum, mettent en doute la valeur du test pharmacodynamique dans le diagnostic du terrain allergique (CRUCHAUD et coll., 26 - BEZIAN, 15). Il semble, de plus, exister une spécificité d'organe. KAPLAN et DAVIS (48) ne constatent aucune fixation d'histamine par un homogénat de poumon de Cobaye.

Cette diminution de l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye en présence de sérum humain normal trouve-t-elle une explication pharmacodynamique ou correspond-elle à une inactivation de l'histamine par combinaison avec une macromolécule sérique.

Des techniques physiques comme l'équilibre de dialyse, l'ultracentrifugation, l'ultrafiltration, la chromatographie de filtration sur gel de Sephadex ont été entreprises. Toutes ont pour but de montrer qu'en présence de sérum humain normal l'histamine se présente sous deux formes : une petite molécule, largement diffusible et un complexe de poids moléculaire élevé.

C/ Equilibre de dialyse

L'histamine introduite à égale concentration de part et d'autre d'une membrane dialysante se déplace vers le compartiment où se trouve le sérum humain normal.

Si le sérum provient d'un sujet allergique, aucun déplacement notable de l'histamine n'est observé.

Les concentrations finales d'histamine sont évaluées par différentes méthodes :

- a) l'histamine est dosée par la méthode pharmacologique sur l'iléon isolé de Cobaye
- b) KLAMERTH (49) la dose par spectrophotométrie à 210nm
- c) on peut également apprécier la coloration rose obtenue en milieu alcalin par copulation de l'histamine avec le chlorure de diazonium de la paranitraniline (PARROT et coll., 65).

Une autre technique consiste à introduire dans le même compartiment un mélange d'histamine et de protéine et à doser l'histamine dans les deux compartiments après équilibre. COHEN et NIEFORTH (21) ont appliqué cette méthode pour déterminer la constante d'association du complexe gamma-globulines-histamine. Elle serait de $5,2 \times 10^5$.

La concentration en histamine du premier compartiment intérieur est celle de l'histamine libre et du complexe histamine protéine. Le deuxième compartiment ne contient que l'histamine libre à une concentration égale à celle de l'histamine libre du premier compartiment. L'histamine est dosée par mesure de la radioactivité β émise par le ^{14}C .

D/ Ultracentrifugation

WALLENFELS et coll. (97) ont montré que, si après addition d'une solution d'histamine à un sérum humain normal, on soumet

le mélange à une ultracentrifugation, une partie de l'histamine est entraînée avec les protéines. En présence de sérum d'allergiques, l'histamine est totalement retrouvée dans le surnageant. L'histamine est ici dosée par une méthode pharmacologique. 10 à 24 μg d'histamine sont fixés par ml de sérum humain normal. Ils constatent qu'après dialyse un sérum d'allergique devient capable de fixer l'histamine.

E/ Ultrafiltration

Si un mélange de sérum humain normal et d'histamine est soumis à une ultrafiltration, on constate qu'une partie de l'histamine ne traverse pas l'ultrafiltre.

La concentration de l'histamine est plus élevée dans le résidu d'ultrafiltration que dans l'ultrafiltrat. Au contraire, si le sérum provient d'un malade allergique, il n'y a pas de différence de concentration entre les deux compartiments. Dans cette technique, l'histamine a pu être dosée par les méthodes biologique et colorimétrique (PARROT et MORDELET-DAMBRINE, 71).

F/ Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex

CERHOVA et CERNIK (19) ont étudié le comportement d'un mélange de sérum humain et d'histamine en chromatographie sur gel de Sephadex G 25. Quand le sérum provient d'un sujet normal, une partie de l'histamine est retrouvée avec les protéines. Le complexe histamine-protéines est élué avec le volume mort de la

colonne, l'histamine libre est plus ou moins adsorbée sur le gel. Quand le sérum étudié est celui de sujets allergiques, le pourcentage d'histamine fixée par les protéines est très faible mais n'est jamais nul.

BEALL (9) équilibre le gel de Sephadex G 25 dans une solution contenant 1,1 µg histamine par ml de liquide de TYRODE, puis réalise sur ce gel une chromatographie d'un mélange de sérum humain normal et d'histamine, il ne constate aucune augmentation de la concentration en histamine dans le clocher protéique obtenu par enregistrement de la densité optique à 280nm. L'histamine est dosée par fluorimétrie. BEALL croit pouvoir conclure de cette expérience que la diminution de l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye en présence de sérum humain normal n'est pas due à une combinaison de l'histamine avec les protéines et que l'histaminopexie, telle qu'elle est définie par PARROT, est un phénomène pharmacodynamique.

G/ Technique de séro-agglutination

Il faut également rappeler le test sérologique mis au point par MIKOL et coll. (56) pour différencier un sérum humain normal d'un sérum de sujet allergique. Après addition d'histamine à une suspension de polystyrène latex, ils montrent que le sérum humain normal agglutine ce mélange même à des dilutions très élevées. Au contraire, quand le sérum provient d'un sujet allergique, l'agglutination n'a pas lieu ou n'existe que pour des concentrations très fortes. PARROT et coll. (68) ont établi un

parallèle entre la technique pharmacologique et le test sérologique. PAUPE (78) a appliqué cette technique chez l'enfant pour le diagnostic de l'allergie humorale. HURIEZ (42) obtient des résultats satisfaisants. Des auteurs russes (59) enfin, en remplaçant le latex par le dermatol, ont même suivi l'évolution de l'allergie pendant le traitement par un mélange gammaglobulines histamine.

II- ETUDE DES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU FACTEUR HISTAMINOPEXIQUE

Si ces différentes techniques physiques mettent en évidence la nature macromoléculaire du facteur sérique capable de fixer l'histamine, elles ne permettent pas d'en préciser les caractéristiques physico-chimiques. Il s'agit probablement d'une protéine et c'est par une étude différentielle de celle-ci que PARROT et ses collaborateurs ont poursuivi leurs recherches.

A/ Identification de ce facteur à une globuline

Les travaux préliminaires ont permis d'identifier ce facteur à une globuline.

Lors d'un relargage par le sulfate d'ammonium à demi-saturation, seule la fraction précipitée diminue l'action contractante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Dans certains cas, les globulines ainsi préparées fixent l'histamine qu'elles proviennent d'un sérum humain normal ou d'un malade allergique (BURTIN-LABORDE, 18).

Parmi les précipités obtenus lors d'un fractionnement des protéines par la méthode de COHN, seule la fraction II, qui précipite à une concentration de 50 p.100 en alcool éthylique et à pH 5,2 (BURTIN-LABORDE,18 - GUIRGUIS, 40) capte l'histamine. Cette fraction est très riche en gamma-globulines.

De la notion de globuline, on passe à celle de glycoprotéine phytosoluble (LABAT et coll.,50). Après précipitation de la plupart des protéines par l'acide phytique, le pouvoir histaminopexique est retrouvé dans le surnageant.

L'albumine restée en solution après élimination des globulines par acidification et la fraction V de COHN essentiellement constituée d'albumine, sont dénuées de pouvoir captant. Elles sont capables, en outre, d'inhiber "in vitro" la fixation de l'histamine soit par le sérum humain, soit par les globulines totales.

L'apparition d'un pouvoir histaminopexique après relargage par le sulfate d'ammonium à demi-saturation et à la suite d'une dialyse de 9 jours (76) d'un sérum de malade allergique laissait prévoir l'existence d'un inhibiteur. On a d'abord pensé que la seule différence qui pouvait exister entre un sérum normal et un sérum d'allergique était due à la présence d'un ion lentement diffusible et inhibiteur de l'histaminopexie. Le potassium pouvait jouer ce rôle mais la notion d'hyperkaliémie n'a pas été retrouvée chez les allergiques. Bien que l'électrophorèse des protides des deux types de sérum ne mette pas en évidence des constituants différents (BENDA et URQUIA,14),

l'étude de leurs protéines a été poursuivie. LABORDE et coll. (51), ont montré que l'histaminopexie est due à une fraction protéique précipitant entre pH 6,5 et 5,2 qui, séparée selon la technique de DEUTSCH (31) est assimilée à une gamma-globuline. Les auteurs l'appellent plasmapexine I. La préparation obtenue représente 4 à 7 pour 10.000 des protides totaux.

Le sérum des sujets allergiques ne contient pas ce composé, mais une autre globuline histaminopexique, non active dans les conditions standard de mesure, absente du sérum normal et associée à un inhibiteur de la plasmapexine I que les auteurs appellent antipexine. Dans le sérum des sujets allergiques il existe au plus 3 $\mu\text{g/ml}$ d'une globuline spécifique de la fixation de l'histamine. Il est bien évident qu'une simple électrophorèse de sérum est incapable de montrer la présence d'une fraction si minime.

B/ Localisation du facteur histaminopexique par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200 et par chromatographie sur échangeurs d'anions

Plus récemment, GUIRGUIS (40) a cherché à définir d'autres caractères physico-chimiques de la protéine étudiée. Il a séparé les constituants protéiques d'un sérum humain normal par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200 et par chromatographie sur échangeurs d'ions comme le D.E.A.E. Sephadex A 50. Le facteur actif sur le test biologique est élué avec les protéines de constante de sédimentation 5 S et est fortement fixé

sur une résine échangeuse d'anions. Ces résultats s'opposent à ceux de PARROT et de ses collaborateurs qui avaient identifié le facteur histaminopexique à une gammaglobuline de constante de sédimentation 7 S qui n'était pratiquement pas retenue sur D.E.A.E. Sephadex A 50.

D'autres auteurs enfin, GESCE et coll. (37) assimilent ce facteur à un polypeptide et non à une protéine. Ces résultats sont discutés dans une étude ultérieure (partie expérimentale Sérum humain, Chapitre V-VI).

Notre travail doit conduire à une meilleure connaissance des caractères physico-chimiques de la protéine obtenue dans un grand état de pureté afin de préciser la nature exacte du phénomène et d'établir son rôle physiologique.

Les observations accumulées au cours de vingt années de recherches, comme l'inhibition du pouvoir histaminopexique par le potassium (PARROT et MORDELET-DAMBRINE, 72, 73), la présence indispensable du calcium, la potentialisation du phénomène par la quercitine (SICILIANO et NIEFORTH, 91) prendront un intérêt nouveau devant ces résultats.

D E U X I E M E P A R T I E

=====

T E C H N I Q U E S U T I L I S E E S

C H A P I T R E I

=====

FRACTIONNEMENT PAR L'ETHANOL

A/ PRINCIPE

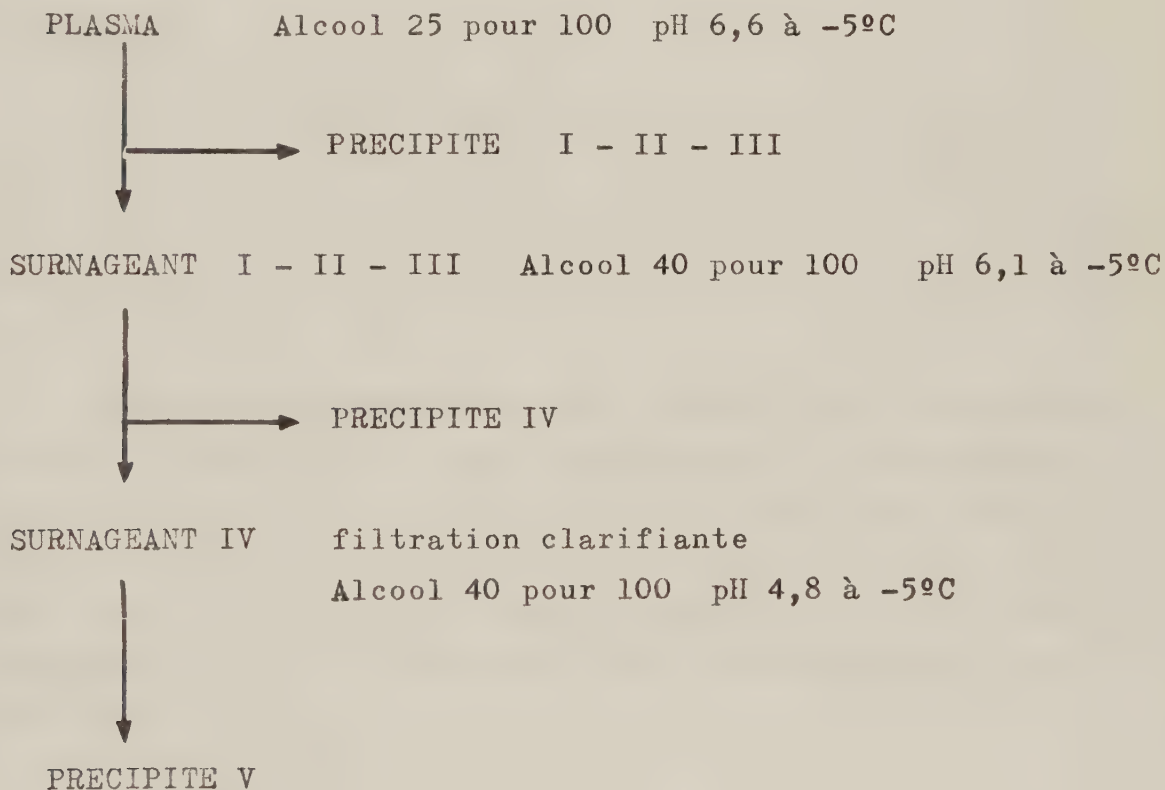
L'addition de solvants organiques miscibles à l'eau à une solution aqueuse de protéines entraîne leur précipitation. Ceci est dû à un changement de la constante diélectrique du milieu; une diminution de sa polarité augmente les forces électrostatiques entre les groupements chargés d'un même ensemble de molécules qui ont alors tendance à précipiter (PENNELL, 81). Les protéines peuvent être plus ou moins dénaturées. Il est cependant possible d'éviter ces phénomènes de dénaturation et d'utiliser les solvants organiques dans le but d'isoler, par précipitation, une protéine.

Parmi les solvants organiques miscibles à l'eau (éthanol, méthanol, acétone, diéthyléther), l'éthanol est le plus couramment utilisé. COHN (23) et ses collaborateurs ont mis au point de multiples techniques de fractionnement des protéines plasmatiques par l'éthanol. Toutes sont basées sur le contrôle strict, à chaque étape, de la force ionique, du pH, de la concentration en éthanol et en protéines du milieu. La dénaturation est évitée en maintenant la température proche du point de congélation. Le respect de ces différents paramètres est indispensable dans la mesure où ils modifient la solubilité des protéines.

A l'échelle industrielle, la sérum-albumine et les immunoglobulines sont préparées par ce procédé. La méthode 6 de COHN conduit à cinq fractions. Dans la méthode 9 de COHN, les fractions II et III sont subdivisées. De multiples modifications sont apportées à ces deux techniques de base.

B/ TECHNIQUE

Au Centre de Transfusion et Réanimation Jean JULLIARD, la sérum-albumine est obtenue par la méthode 6 de COHN modifiée. Les fractions I - II et III sont précipitées en une seule opération.



C H A P I T R E I I

=====

PREPARATION D'UN EXTRAIT PHYTIQUE

I/ PRINCIPE

En milieu acide, de pH 2,0 à 4,5, l'acide inosito-hexaphosphorique ou acide phytique, se combine aux protéines qui précipitent. Cette précipitation n'est optimale que dans certaines conditions de pH, de force ionique et de concentration en acide phytique.

Certaines protéines du sérum humain sont phytosolubles. AGNERAY (1) en a fait l'étude systématique, l'orosomucoïde ou glycoprotéine α_1 acide est le composant majeur. Bien que la composition qualitative du surnageant varie en fonction de la force ionique du milieu de réaction (COURTOIS et coll., 24), la sérumalbumine et la transferrine sont toujours précipitées à ce pH de 2,1.

II/ TECHNIQUE

Nous utilisons ici la technique proposée par AGNERAY (1). Un volume de sérum humain dilué par 3 volumes d'eau distillée est amené à pH 2,1 puis précipité par 6 volumes d'une solution 0,1 N d'acide phytique.

Après quelques heures de contact, le surnageant et le précipité sont séparés par centrifugation, le précipité redissous dans une solution alcaline de chlorure de sodium est dialysé, concentré et lyophilisé.

Le surnageant amené à pH 5,0 est dialysé contre l'eau distillée fréquemment renouvelée, concentré et lyophilisé. Il constitue alors l'EXTRAIT PHYTIQUE.

C H A P I T R E I I I

=====

RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

I- PRINCIPE

Le principe de cette méthode repose sur la diminution de la solubilité des protéines en présence de fortes concentrations en sels neutres (SCHULTZE et HEREMANS, 86).

Les courbes de solubilité en fonction de la molarité en sels neutres sont variables d'une protéine à l'autre.

Les relargages sont effectués à température constante, à 4°C et sur une solution diluée afin d'éviter les phénomènes d'adsorption sur le précipité en formation. On se trouve alors en face de volumes importants contenant de faibles concentrations de produit à étudier qu'il faut concentrer.

II- TECHNIQUE

Les concentrations en sel neutre sont ajustées soit par une solution saturée de sulfate d'ammonium dont la concentration molaire à 15°C est voisine de 4 M, soit par l'adjonction directe de sel dans la solution à étudier.

Dans le premier cas, on utilise la formule

$$X = \frac{V_1 (C_2 - C_1)}{4 - C_2}$$

Dans le deuxième cas

$$Y = \frac{530 \cdot V_1 (C_2 - C_1)}{1000 (4 - 0,285 C_2)}$$

X	volume en ml de solution à utiliser dans le premier cas
Y	poids de sulfate d'ammonium cristallisé à utiliser dans le 2ème cas
V_1	volume de la solution initiale en ml
C_1	concentration molaire de la solution initiale en sulfate d'ammonium
C_2	concentration molaire en sulfate d'ammonium que l'on veut obtenir
530	concentration en g/l de sulfate d'ammonium d'une solution saturée
0,285	volume en ml occupé par le sulfate d'ammonium dans 1 ml de solution saturée

C H A P I T R E I V

=====

CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL POLYMERISE HYDROPHILE

Nous avons utilisé en chromatographie deux types de gel hydrophile; le Sephadex commercialisé par Pharmacia Fine Chemicals et le Biogel commercialisé par les Laboratoires BIO-RAD.

I- CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX

A- PRINCIPE

Le Sephadex est un gel de dextran polymérisé en présence d'épichlorhydrine en milieu alcalin. Il y a formation de mailles dont la taille varie selon le nombre de ponts glycéryles. c'est-à-dire selon la quantité d'épichlorhydrine utilisée pour condenser les chaînes glycanes (FLODIN,34).

Mise au contact avec l'eau, cette poudre de Sephadex gonfle pour donner des petites particules de gel. Ce gonflement dépend de la quantité d'eau qui pénètre à l'intérieur des mailles, et par conséquent, du degré de réticulation. On définit donc la réticulation du Sephadex par le poids d'eau utilisé pour obtenir le gonflement de 10g de poudre sèche.

Un Sephadex G 25 (25g d'eau pour 10g de poudre) est très finement réticulé alors qu'un Sephadex G 200 (200g d'eau pour 10g de poudre) aura des mailles beaucoup plus lâches.

En chromatographie, le Sephadex crée deux phases. La première est représentée par la solution à l'intérieur des mailles, c'est la phase immobile. La seconde est constituée par le liquide entre les grains du support, c'est la phase la plus mobile. La répartition des substances entre les deux phases n'est pas fonction de la solubilité mais dépend uniquement du volume moléculaire des substances à séparer. Avec une colonne de Sephadex G 200, les protéines de faible poids moléculaire peuvent pénétrer à l'intérieur des grains du support, elles sont éluées plus tardivement que celle de poids moléculaire élevé.

Ces protéines de poids moléculaires différents sont éluées par des quantités variables de tampon. On peut donc définir certains paramètres (AGNERAY, 2).

- V_0 est le volume extérieur aux grains de gel, c'est-à-dire le volume de liquide nécessaire pour éluer une grosse molécule totalement exclue du gel (Bleu Dextran).

- V_i ou volume interstitiel est le volume de la phase liquide à l'intérieur des grains du gel.
- V_g est le volume des chaînes polydextranes et ponts glycérides de la substance elle-même.
- V_t est le volume total d'une colonne de gel

$$V_t = V_o + V_i + V_g$$

$\frac{V_e}{V_o}$ est le rapport du volume d'élution d'une substance inconnue sur le volume d'élution d'une grosse molécule exclue du gel.

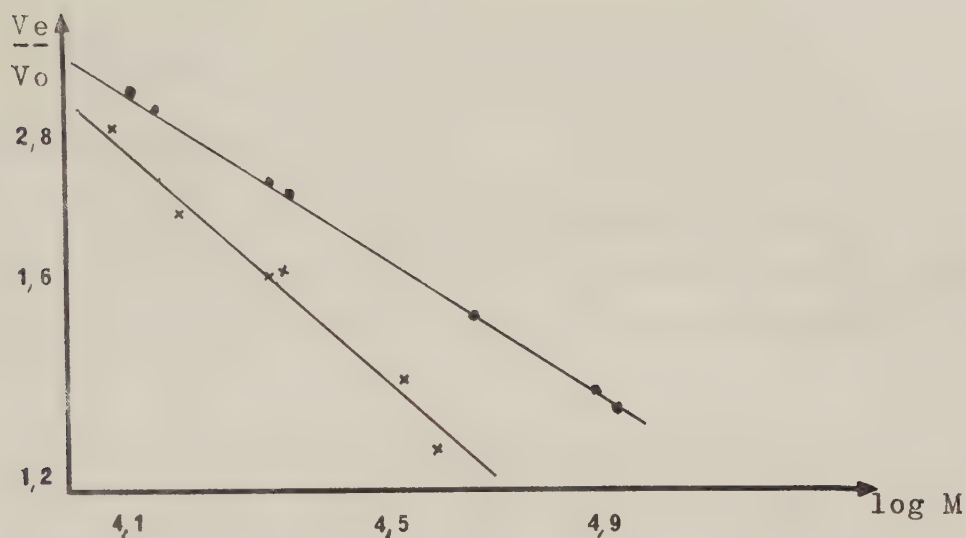
Ce rapport $\frac{V_e}{V_o}$ est une fonction logarithmique du poids moléculaire (WHITAKER, 98).

Pour une colonne donnée : $V_e = V_o + K V_i$. Donc $K = \frac{V_e - V_o}{V_i}$
pour le Bleu Dextran, $K = 0$.

Le coefficient K et le rapport $\frac{V_e}{V_o}$ sont caractéristiques de chaque protéine (ANDREWS, 5) (voir figure I).

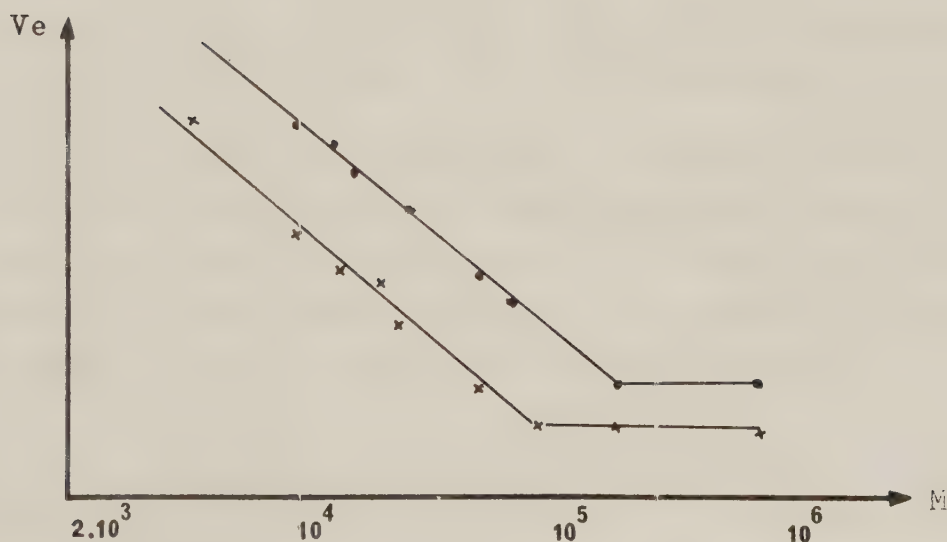
Ainsi la chromatographie d'un sérum sur un Sephadex G 200, avec une élution par un tampon Tris 0,1 M, NaCl 1 M ajusté à pH 8, donne après enregistrement à 200 nm trois pics dont les $\frac{V_e}{V_o}$ sont de :

- pour les protéines 19 S 1,10
- pour les protéines 7 S 1,60
- pour les protéines 5 à 4 S 1,90



VARIATIONS DE $\frac{V_e}{V_o}$ EN FONCTION DE $\log M$

. . . . : sur une colonne de SEPHADEX G 100 (1,1x192cm)
 x x x x : sur une colonne de SEPHADEX G 75 (1,2x184cm)
 (WHITAKER, 98)



VARIATIONS DE V_e EN FONCTION DE M (coordonnées semi-logarithmiques)

. . . . : sur une colonne de SEPHADEX G 100 (2,4x50cm)
 x x x x : sur une colonne de SEPHADEX G 75 (2,4x50cm)
 (ANDREWS, 5)

B- TECHNIQUE

- Préparation du gel

La quantité de poudre de Sephadex nécessaire pour remplir une colonne donnée peut être facilement calculée puisque chaque qualité de Sephadex est définie par sa capacité de gonflement dans l'eau.

La poudre mise à gonfler dans un excès d'eau distillée pendant 3 jours est équilibrée dans le tampon.

- Tampon utilisé

Tris 0,1 M

NaCl 1 M

ajusté à pH 8,0 par HCl N

- Remplissage de la colonne

Nous avons travaillé sur des colonnes ascendantes permettant une marche continue et ne se tassant pas.

Nous fermons la colonne par le système piston et filtre à la partie inférieure. Le gel mélangé avec une quantité suffisante de tampon est versé dans la colonne en une seule fois. On adapte, pour cette opération, un entonnoir au sommet de la colonne, destiné à contenir l'excès de mélange.

Le remplissage terminé, la colonne est fermée, convenablement tassée par passage d'un volume d'éluant égal à 2 ou 3 fois le volume du gel.

- Application de l'échantillon

Le volume d'échantillon ne doit pas dépasser la différence des volumes d'élution entre deux clochers. La concentration n'est importante que dans la mesure où elle joue sur la viscosité.

II- CHROMATOGRAPHIE SUR BIOGEL

A/ PRINCIPE

Le Biogel est obtenu par condensation de l'amide acrylique avec le N,N' méthylène bis acrylamide. La grosseur des pores dans le gel final dépend toujours, principalement de la concentration totale en monomère et en second lieu du pourcentage en monomère bifonctionnel (DETERMANN,30).

Fourni sous forme de perles, le Biogel gonfle dans l'eau pour donner un gel. Comme pour le Sephadex, le gonflement détermine la zone d'utilisation. Il en existe "onze" formes différentes au point de vue de leur capacité d'absorption d'eau (Tableau II).

TABLEAU II

TYPES DE BIOGEL DISPONIBLES

Type	Eau réabsorbée (Eau mg/g)	Volume du gel (mg/ml)	Zone de fractionnement pour les peptides et les protéines globulaires
P ₂	1,6	3,8	200 - 2.000
P ₄	2,6	6,1	500 - 4.000
P ₆	3,2	7,4	1.000 - 5.000
P ₁₀	5,1	12	5.000 - 17.000
P ₃₀	6,2	14	20.000 - 50.000
P ₆₀	6,8	18	30.000 - 70.000
P ₁₀₀	7,5	22	40.000 - 100.000
P ₁₅₀	9,0	27	50.000 - 150.000
P ₂₀₀	13,5	47	80.000 - 300.000
P ₃₀₀	22,0	70	100.000 - 400.000

Les paramètres définis pour le Sephadex s'appliquent tout à fait au Biogel.

B/ TECHNIQUE

Les conditions de préparation du Biogel et de remplissage de la colonne de chromatographie sont tout à fait comparables à celles décrites pour le Sephadex.

C H A P I T R E V

=====

ELECTROPHORESE DE ZONE EN GRADIENT DE DENSITE

A/ PRINCIPE

A l'échelle préparative, la séparation électrophorétique des protéines est réalisée dans un milieu liquide stabilisé par un gradient de densité qui décroît de bas en haut. Les protéines se déplacent contre ce gradient ce qui limite la diffusion et diminue les courants de convection. Le gradient doit être linéaire et présenter une pente suffisante tout le long de la colonne.

Un tel support offre de nombreux avantages. L'électrophorèse de zone en gradient de densité permet de séparer parfaitement les divers composés protéiques d'un mélange, ce qui est impossible par électrophorèse de frontière. L'absence de phénomènes d'adsorption et une élution facile et rapide des fractions séparées donnent à l'électrophorèse de zone en gradient de densité un gros avantage sur l'électrophorèse de zone sur support inerte (cellulose).

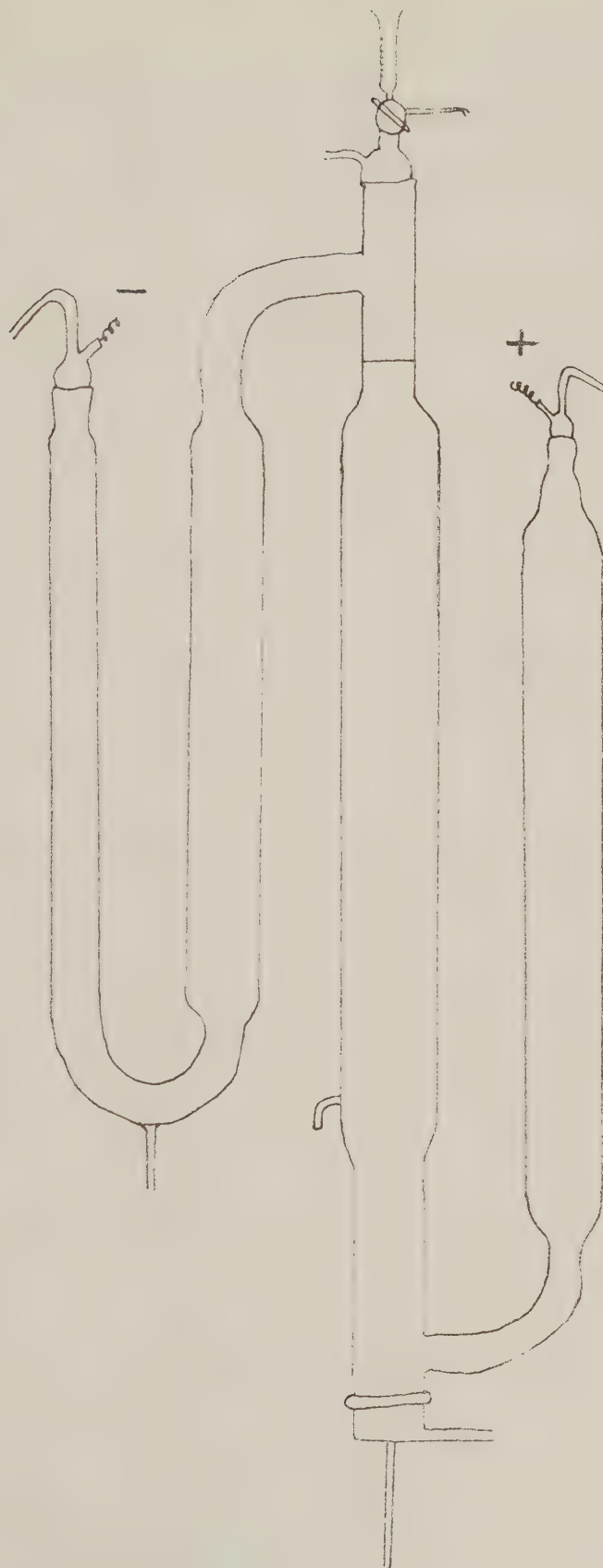


Fig 2

Appareillage LKIB

N° 3340C

B/ REACTIFS

R ₁	solution tampon	
	barbital sodique	3g
	eau distillée	1 litre
	ajustée à pH 8,2 par HCl N	
R ₂	saccharose R.A.L.	500g
	R ₁	1 litre
R ₃	saccharose R.A.L.	200g
	R ₁	1 litre
R ₄	saccharose R.A.L.	600g
	R ₁	1 litre

C/ TECHNIQUE

1) Appareil

L'appareil L.K.B. 3340C (Figure 2) est constitué d'une colonne de migration thermostatée à 15°C en communication à sa partie supérieure avec le compartiment cathodique et à sa partie inférieure avec le compartiment anodique.

2) Création d'un gradient de densité continu

Un gradient peut être discontinu; il est alors obtenu manuellement par superposition de solutions de densités décroissantes.

Il peut être continu. Dans ce cas, au lieu de diminuer la concentration par paliers successifs, il est possible de la faire varier progressivement.

Principe

Les systèmes générateurs de gradients ont en commun le principe suivant : un récipient de réserve dont le contenu présente un volume variable mais une composition constante a pour fonction de modifier progressivement le contenu d'un récipient de mélange qui alimente l'appareil (LEBRETON, 54).

Deux montages courants sont proposés. Le premier est constitué de deux vases communicants dont les volumes demeurent dans un rapport constant tout au long du mélange. Dans le deuxième cas, le récipient mélangeur garde son volume constant.

Dispositifs

- à deux récipients communicants (Figure 3a)

Si les deux vases B et C sont identiques, le gradient est linéaire mais la pente est douce. En effet, nous constatons au départ un apport de solution de forte concentration dans un grand volume de solution diluée

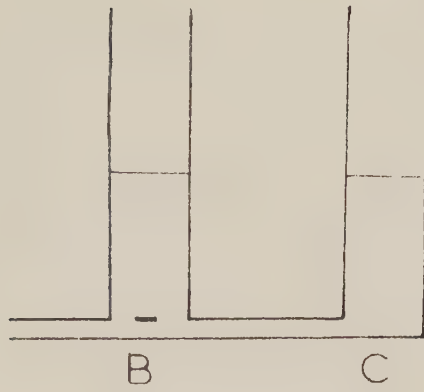
- à deux récipients dont un à volume constant (Figure 3b)

Le récipient de mélange A conserve toujours le même volume. La densité du mélange tend alors exponentiellement vers celle du liquide du récipient de réserve B. La pente du gradient, au départ, peut être plus accentuée que dans le cas précédent.

- à trois récipients dont un à intervention retardée (Figure 3c)

Pour maintenir la linéarité du gradient, il est possible de placer à la suite du système précédent, un troisième flacon C dont le contenu ne s'écoule qu'au moment voulu.

a



b

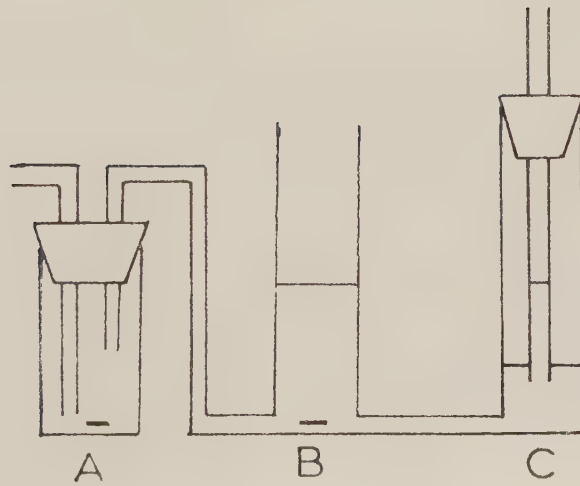
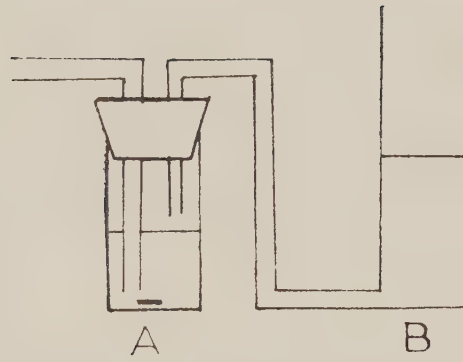


Fig 3 c

SYSTEMES GENERATEURS DE GRADIENTS DE DENSITE

Etude expérimentale

Pour l'étude systématique de ces types de gradients, nous opérons avec des solutions de bleu de méthylène afin de mesurer facilement l'effet des concentrations et des volumes relatifs des solutions des différents récipients. Sur le tracé final, nous portons en abscisses les volumes de solution de densités croissantes prélevée dans le récipient A, en ordonnées, les densités optiques correspondantes. Il est plus facile de suivre l'absorption de la lumière émise à 550 nm par des solutions de bleu de méthylène de concentrations croissantes que l'augmentation de densité des solutions de saccharose. Nous avons néanmoins tracé quelques gradients à l'aide de solutions de saccharose et nous avons constaté, en respectant les mêmes conditions opératoires, une superposition parfaite des tracés obtenus par détermination de la densité des solutions de saccharose et par mesure de la densité optique des solutions de bleu de méthylène.

Pour établir le gradient dans l'appareil d'électrophorèse, seuls les systèmes à volume constant et à intervention retardée sont retenus.

Dispositifs retenus

a) 175ml de réactif R_1 constituent la solution de faible densité et 300ml de réactif R_2 celle de forte densité. Après introduction de 300ml du mélange dans l'appareil, l'écoulement est stoppé. Dès le départ, le gradient établi est linéaire et de pente raide, conditions indispensables au dépôt correct de l'échantillon : la prise d'essai ne doit pas diffuser. Par contre, nous constatons que dans la zone des fortes

concentrations en saccharose, les variations de densité sont faibles. Ceci provoque une diffusion sensible des protéines de grande mobilité (Figure 4a). Pour pallier cet inconvénient nous avons réalisé un montage permettant de redresser la pente du gradient dans la zone désirée.

β) Le flacon A contient 50ml de réactif R_1 et le volume demeure constant. Les flacons B et C sont à niveau constant; le premier des vases communicants contient 200ml de réactif R_3 et le second 100ml de réactif R_4 dans lequel plonge un tube. Le tampon monte dans le tube jusqu'à ce qu'il ait atteint le niveau du contenu du flacon B (Figure 3c). Lors du passage du premier tiers du mélange, une diminution de niveau du liquide du flacon B entraîne une diminution identique de celui du contenu du tube du flacon C; l'apport de solution de forte densité est négligeable. Dès que le tube est vide, pour une même variation de niveau en B, le volume de tampon R_4 déplacé est beaucoup plus important; ceci permet de maintenir la pente du gradient qui tendrait à s'écraser (Figure 4b).

3) Electrophorèse de zone en gradient de densité

L'échantillon constitué par 100 à 200mg de poudre lyophilisée est dissous dans le tampon R_1 puis dialysé contre ce même tampon pendant 24 heures.

Avant son introduction dans l'appareil, la prise d'essai est amenée à la densité de la zone d'ensemencement. Dans ce but, un volume donné de liquide est prélevé dans la partie supérieure de l'appareil et sa densité est comparée à celle de la prise d'essai. Si celle-ci n'est pas assez dense, il

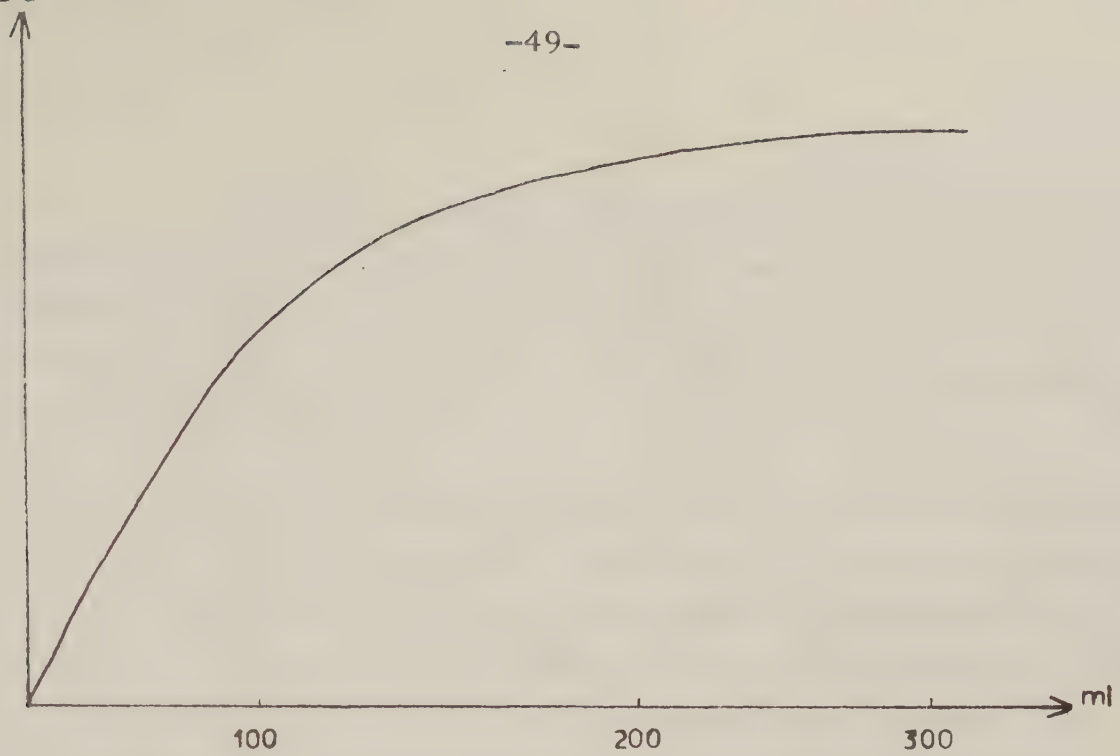


Fig 4 a Pente d'un gradient de saccharose obtenu avec le système à volume constant

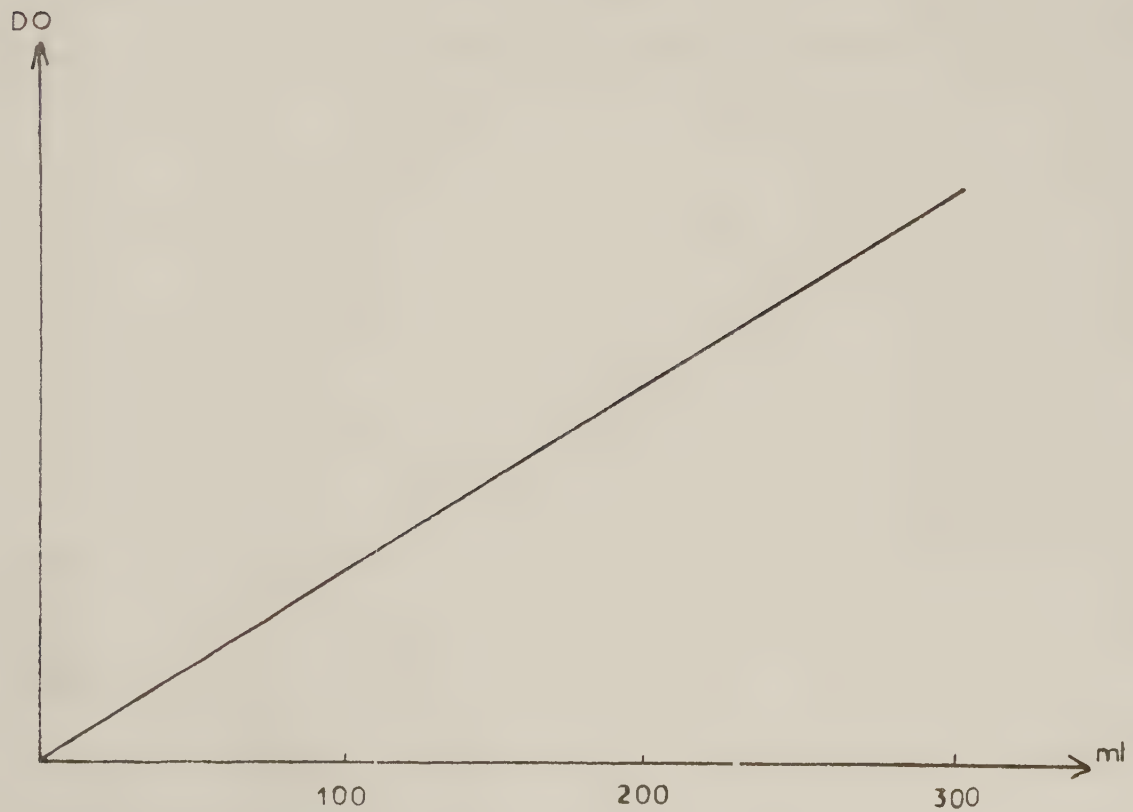


Fig 4 b Pente d'un gradient de saccharose obtenu avec le système à intervention retardée

faut lui ajouter soit quelques gouttes de solution de forte concentration, soit le saccharose lui-même, en proportion convenable. La séparation est obtenue sous une différence de potentiel de 550 volts et une intensité de 18 milliampères pendant 16 heures.

Le débit de l'élution est régularisé par une pompe péristaltique. Recueilli dans un collecteur, l'éluat est regroupé en fractions d'après le tracé obtenu par enregistrement de sa densité optique à 280nm. Une dialyse contre l'eau distillée fréquemment renouvelée est indispensable pour éliminer le saccharose. Les échantillons sont ensuite lyophilisés.

Nous avons appliqué cette technique de fractionnement au sérum et à diverses préparations protéiques préalablement enrichies. Ce type d'électrophorèse ne s'applique qu'à un volume très faible de prise d'essai et de ce fait, ne trouve sa place que dans les derniers stades de purification d'une protéine.

C H A P I T R E V I

=====

ELECTROFOCALISATION

A/ PRINCIPE

Pendant l'électrophorèse libre d'une solution saline stable, on constate la formation d'acide à l'anode et de base à la cathode; des valeurs croissantes de pH apparaissent entre ces deux électrodes.

Si on introduit dans ce milieu un mélange de corps amphotères de points isoélectriques très voisins, chaque composé s'immobilise à des niveaux différents ce qui entraîne la formation d'un gradient de pH.

L'application prolongée d'un champ électrique dans ce gradient de pH entraîne la focalisation des protéines introduites aux valeurs de pH correspondant à leurs points isoélectriques respectifs (Figure 5).

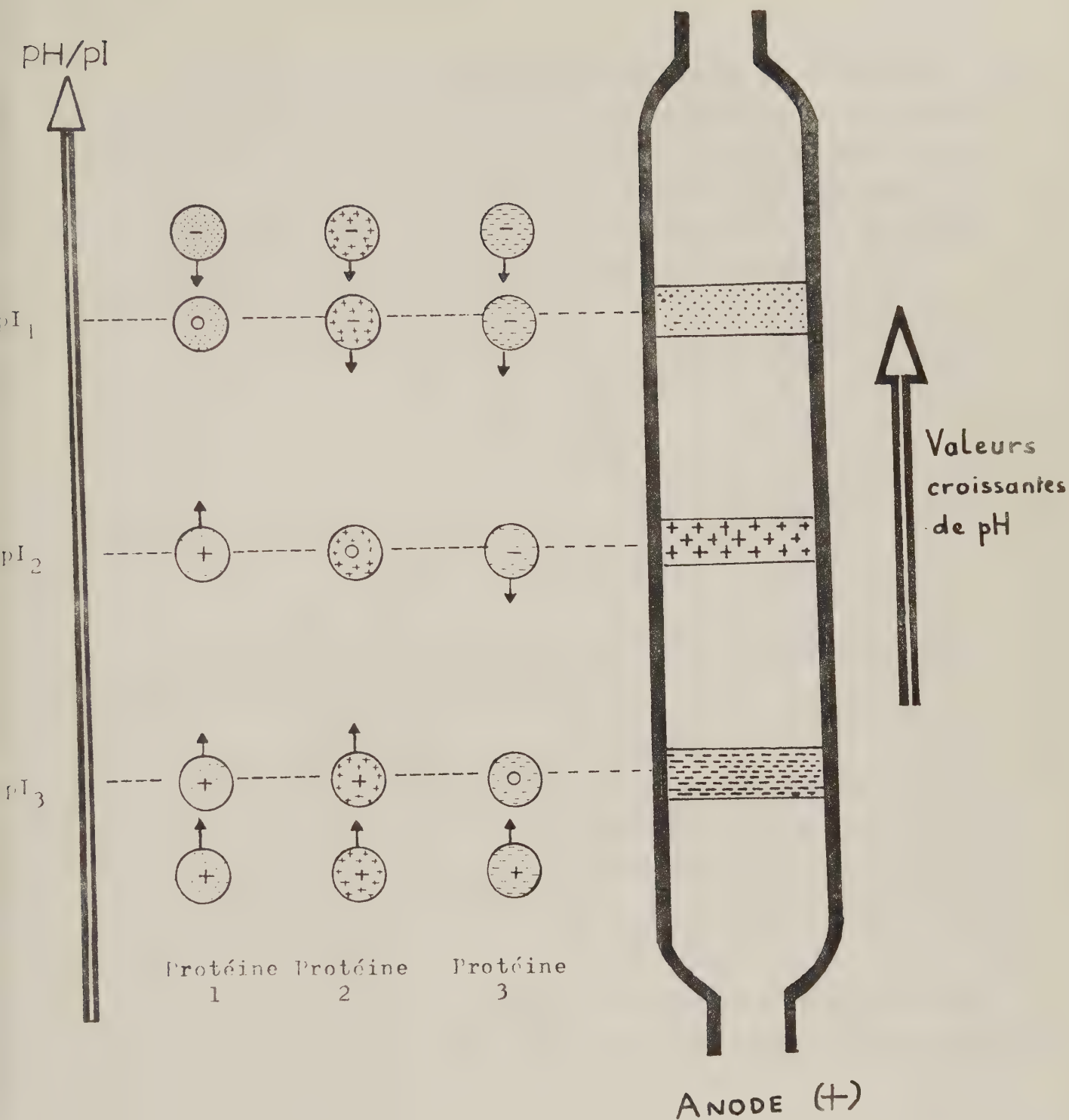
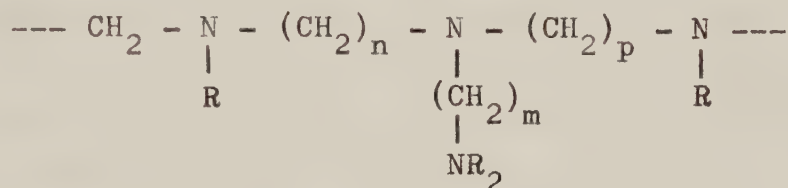


Fig.5 - FOCALISATION DES PROTEINES à leur POINT ISOELECTRIQUE

Ce gradient doit permettre une gamme de pH déterminée et être aussi doux que possible. Ces conditions difficilement réalisables par des solutions tampons, le sont devenues grâce aux Ampholines mises au point par SVENSSON (92). Ce sont des acides aliphatiques polyaminés et polycarboxyliques de poids moléculaire inférieur à 1000 de formule générale.



$$m \ n \ p \ x = < 5$$

Chaque ampholine doit pouvoir présenter un bon pouvoir tampon à son point isoélectrique :

- pour bien définir le pH à ce point
- pour dominer les ampholytes qui traversent sa zone
- pour assurer une bonne conductivité. Ceci est important puisque l'ampholine étant à son point isoélectrique et étant la seule à transporter les charges, c'est elle qui assure le passage du courant.

Les Ampholines commerciales couvrent des valeurs de pH de 3 à 10 et peuvent donner des gradients s'étalant généralement sur deux unités pH.

- | | |
|----------|----------|
| - 3 à 10 | - 4 à 6 |
| - 3 à 6 | - 5 à 7 |
| - 5 à 8 | - 6 à 8 |
| - 7 à 10 | - 7 à 9 |
| - 3 à 5 | - 8 à 10 |

Il est nécessaire d'associer à ce gradient de pH, un gradient de densité pour éviter les courants de convection et assurer la stabilité des protéines focalisées.

La séparation isoélectrique est réalisée dans une colonne LKB 8101 de 110ml et 8102 de 440ml (Figure 6). La chambre de migration comprise entre deux cylindres concentriques est thermostatée par circulation d'eau à +15°C. Les électrodes de platine sont placées de telle sorte que le dégagement gazeux à leur contact ne puisse pas perturber la focalisation; de plus ces électrodes sont isolées des ampholines par des solutions diluées d'acide ou de base afin d'éviter leur oxydation anodique et leur réduction cathodique.

Le choix de la polarité de l'électrode est lié à la zone désiré. En effet, si l'on étudie les variations de la conduction en fonction de la concentration en saccharose et en fonction du pH (Figure 7), on constate que la conductance est diminuée pour de fortes concentrations, elle est faible dans la zone de pH 6,0 à 8,0. Pour des valeurs de pH inférieures à 6,0, l'anode constitue l'électrode inférieure afin de compenser une forte concentration en saccharose par une acidité marquée.

La concentration en Ampholines ne doit pas être inférieure à 1% pour maintenir un pouvoir tampon suffisant. Une augmentation de leur concentration favorise la solubilisation des protéines qui ont tendance à précipiter à leur point isoélectrique.

B/ REACTIFS

Anode à la partie inférieure

	LKB 8101 (110ml)	8102 (440ml)
acide sulfurique	0,2 ml	0,8 ml
eau distillée	14 ml	56 ml
saccharose BDH	12 g	48 g



Fig 6

Appareillage LK B

N° 8101 et 8102

ELECTRO

FOCALISATION

Cathode à la partie supérieure

Na OH	0,25 ml	1 ml
Eau distillée	10 ml	40 ml

Solution de forte densité

Ampholine à 40%	3,75 ml	15 ml
de pH 3,0 à 5,0		
Saccharose BDH	28 g	100 g
Eau distillée q.s.p.	42 ml	150 ml

Solution de faible densité

Ampholine à 40%	1,25 ml	5 ml
de pH 3,0 à 5,0		
Eau distillée q.s.p.	60 ml	215 ml

C/ TECHNIQUE

1) Etablissement du gradient de densité

Dans une série de tubes, nous mélangeons au préalable les solutions de faible et forte densités en proportions convenables.

La mise en place de l'échantillon peut se faire à n'importe quel niveau car la focalisation des protéines ne dépend que de leur point isoélectrique. Il suffit donc de remplacer un volume de solution de faible densité par un volume égal de prise d'essai.

La teneur souhaitable en protéines de l'échantillon dépend de son hétérogénéité. 5 à 25mg de protéines pour une étude analytique et 20 à 100mg à l'échelle préparative représentent les concentrations optimales par bandes séparées.

Après introduction de la solution anodique dans l'appareil, le gradient est établi par superposition des fractions de densité décroissante précédemment préparées. La solution alcaline isole la cathode.

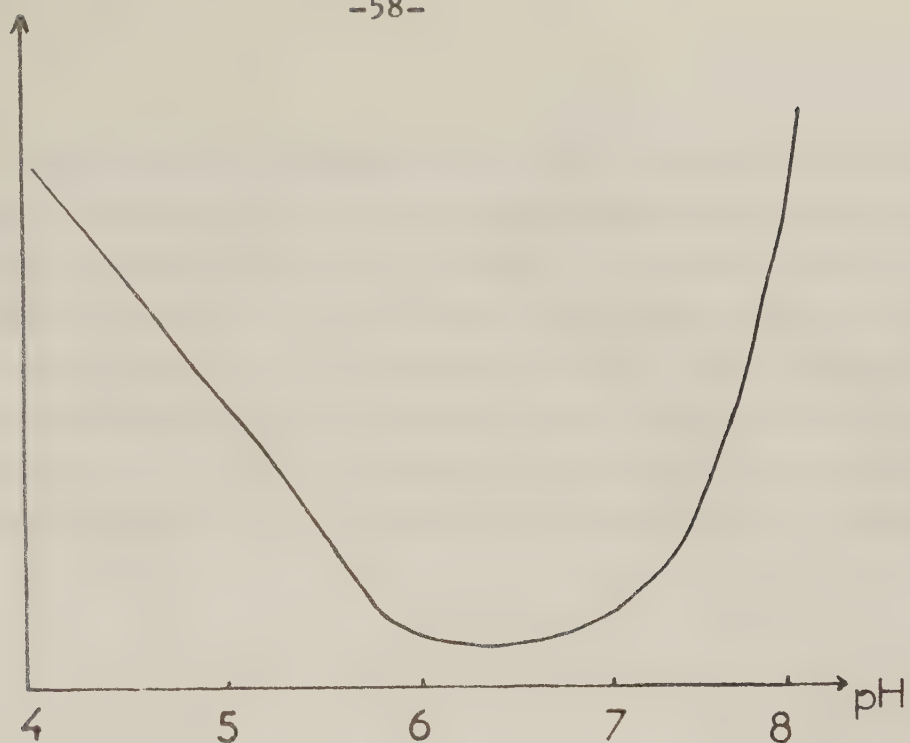
2) Fractionnement

Une différence de potentiel est appliquée de telle sorte que la puissance ne dépasse pas 2 à 3 watts pour l'appareil 8101 et 4 à 6 watts pour l'appareil 8102 pendant 48 à 72 heures. Il est bon de prolonger l'opération 24 heures après stabilisation du courant.

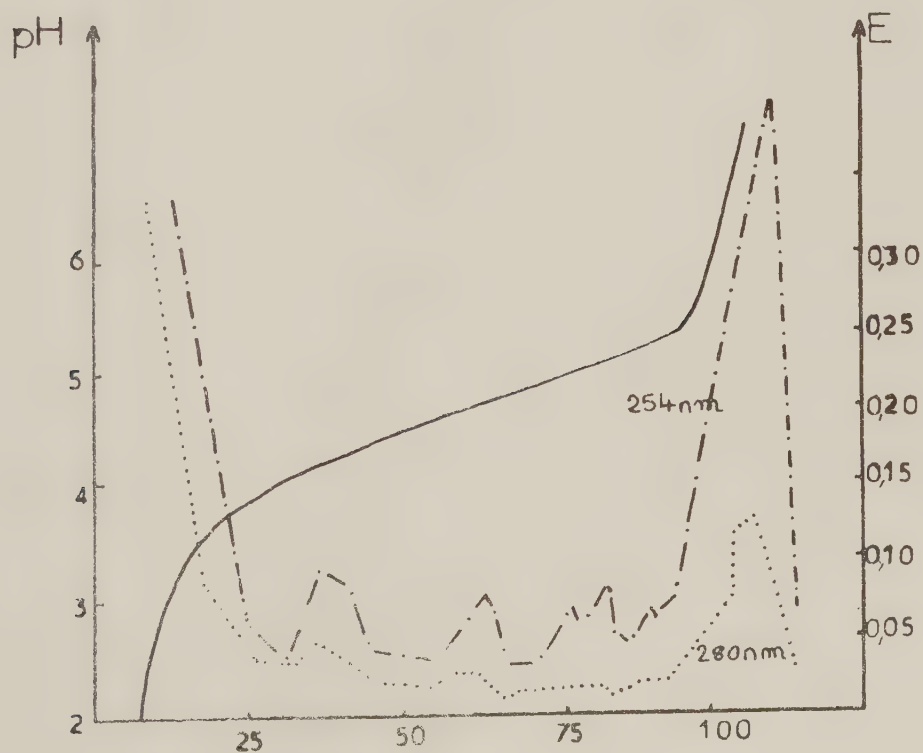
3) Elution

Par suite de l'étroitesse et de la proximité des zones séparées, l'élution doit être menée avec soin afin d'éviter toutes diffusion et perte de résolution. Ces risques sont limités en éluant le milieu de focalisation par une pompe péristaltique à débit très régulier. Mais comme d'autre part, il est préférable de réduire à son minimum le volume mort entre le bas de la colonne et le densitomètre, il est difficile de placer cette pompe entre les deux appareils. L'élution est obtenue en déplaçant le contenu de la colonne par de l'eau distillée dont le débit est régularisé par une pompe LKB Perpex.

Après enregistrement de la densité optique de l'éluat à 280nm et à 250nm et détermination du pH à la même température que celle à laquelle a eu lieu la migration, les fractions sont regroupées en fonction du tracé et du pH.

Fig 7

Variation de la conductance en fonction du pH

Fig 8

Variation de l'absorbance d'un mélange d'ampholine pH 3-5 en fonction du pH

Il faut être très prudent lors de l'interprétation de ces tracés; en effet, les Ampholines absorbent de façon non négligeable la lumière émise à 280nm et à 254nm (Figure 8). Si les Ampholines et le saccharose sont séparés par chromatographie de filtration sur Sephadex G 25 ou G 50 (VESTERBERG, 96), nous pouvons déterminer précisément leur volume d'élution et de là savoir si le clocher observé correspond à une protéine ou est un artefact dû à l'absorption anarchique de l'Ampholine.

C H A P I T R E V I I

=====

MODALITE DE L'ETUDE PHARMACOLOGIQUE

A/ PRINCIPE

La diminution de l'activité biologique de l'histamine est mesurée par la méthode pharmacologique sur l'iléon isolé de Cobaye (LABORDE et coll.,52). Nous utilisons un milieu physiologique constitué par du liquide de TYRODE préconisé par les auteurs auquel nous ajoutons :

glucose	$0,25 \times 10^{-3}$ g/l
sulfate d'atropine	$0,50 \times 10^{-7}$ g/l

B/ TECHNIQUE

a) Le bain contenant l'organe a un volume utile de 20ml; l'ensemble est thermostaté à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,2$.

L'iléon isolé provient de cobayes mâles pesant de 300 à 500g, il est suspendu dans le liquide de TYRODE sous une tension de 2 grammes.

Les contractions sont enregistrées à l'aide d'une jauge de contrainte reliée à un potentiomètre enregistreur.

b) Après avoir étudié la sensibilité de l'iléon utilisé et déterminé la zone différentielle la meilleure, nous essayons deux témoins :

- un positif : sérum humain normal ou fraction protéique diminuant l'activité biologique de l'histamine et ayant été testé plusieurs fois auparavant.
- un négatif : sérum humain allergique ou fraction protéique non active déjà étudié plusieurs fois auparavant

Nous pouvons ainsi éliminer les iléons donnant des réponses aberrantes. Ils représentent environ 2 pour 100 des iléons essayés.

Les protéines en poudre sont dissoutes dans le liquide de TYRODE et la concentration est calculée pour que nous ayons $30 \cdot 10^{-6}$ g/ml de préparation au contact de l'organe.

c) L'essai proprement dit consiste à comparer la hauteur des contractions obtenues :

- d'une part avec la dose de dichlorhydrate d'histamine de référence choisie

- d'autre part avec un mélange contenant l'histamine à la même concentration et la fraction à étudier à la concentration voulue.

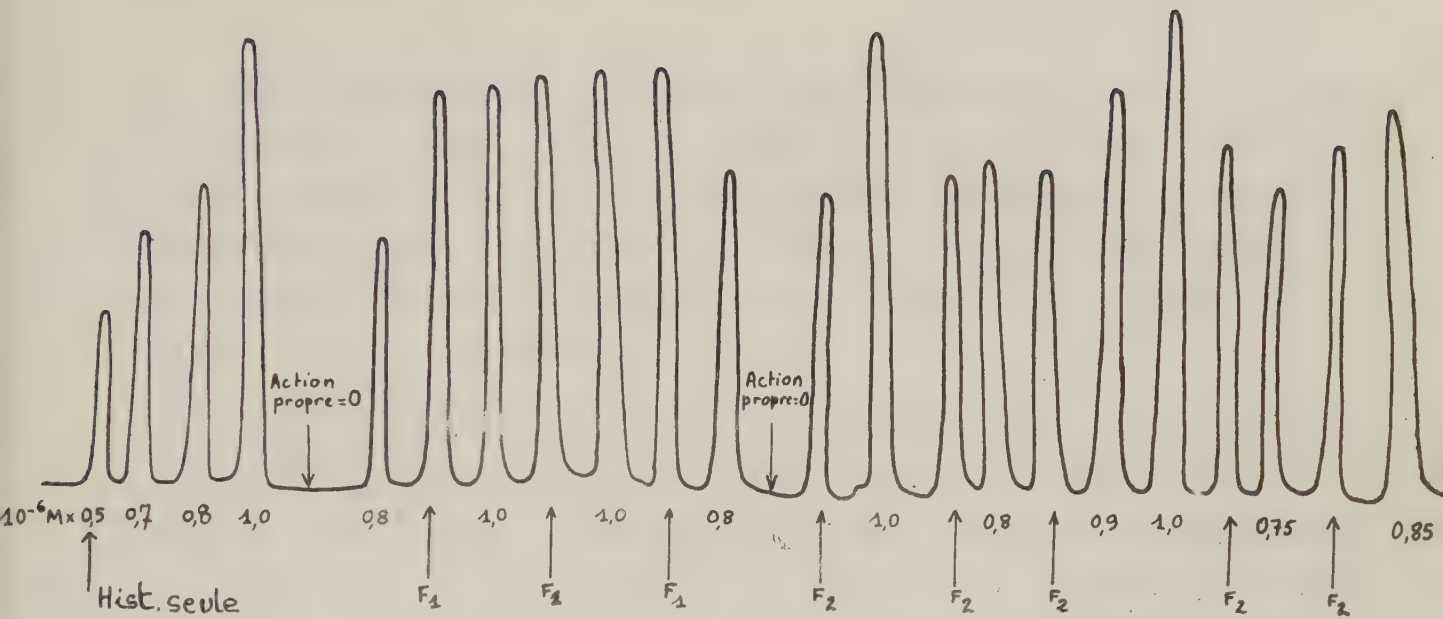
Si la fraction est inactive, les hauteurs de contraction sont les mêmes ou très voisines.

Si la fraction est active, la hauteur de la contraction déclenchée par le mélange histamine et fraction étudiée est inférieure à celle produite par la dose de référence d'histamine. A l'aide d'une gamme d'histamine nous apprécions la diminution de l'activité en pourcentage. Il faut toujours intercaler une contraction histamine et protéine associées entre deux contractions dues à l'histamine seule et provoquer trois contractions avec le mélange histamine-protéine (Figure 9).

Avant d'essayer le mélange histamine-protéine, nous recherchons si la fraction étudiée ne possède pas d'action propre en mettant l'iléon en contact avec celle-ci à une concentration égale à celle du mélange.

Nous étudions aussi l'activité des fractions par dilutions successives. En portant en abscisses sur une échelle logarithmique les inverses des concentrations et en ordonnées les pourcentages d'histamine fixée par échantillon étudié, nous constatons que l'activité maximale se maintient, décroît pour s'annuler à des taux variables suivant les fractions étudiées (Figure 10).

La détermination systématique de la capacité de fixation de l'histamine d'un sérum ou d'une fraction protéique est réalisée de façon à se trouver dans la zone maximale de captation, c'est-à-dire au niveau du plateau.



dose de référence d'histamine = $1,0 \times 10^{-6} \text{M}$

F_1 = mélange de la Fraction 1 + histamine $1,0 \times 10^{-6} \text{M}$
(Fraction inactive)

F_2 = mélange de la Fraction 2 + histamine $1,0 \times 10^{-6} \text{M}$
(Fraction diminuant de 20p.100 l'activité biologique de l'histamine)

Fig.9 - Test pharmacologique sur l'iléon isolé de cobaye.

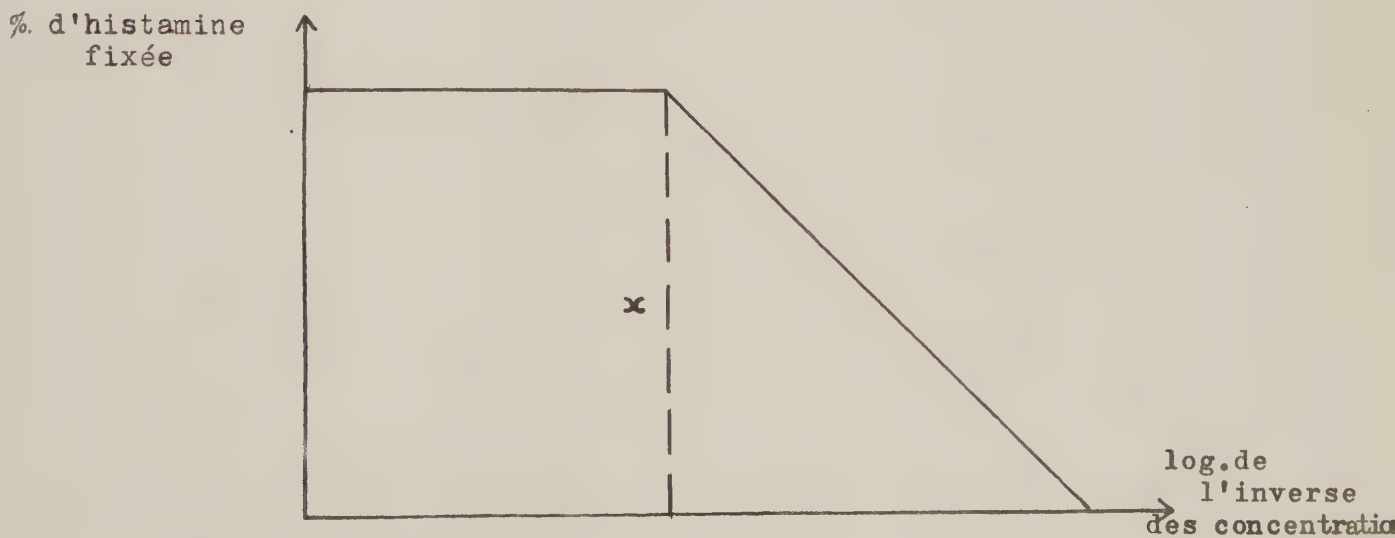


Fig.10 - Détermination de l'unité d'activité

Par une série de dilutions, nous constatons que ce plateau se maintient jusqu'à une concentration x qui correspond à une unité d'activité. C'est le poids minimal de préparation qui, dissoute dans un ml de liquide de TYRODE, au contact de l'iléon isolé de Cobaye, diminue au maximum pour un échantillon, l'activité biologique de l'histamine.

Chaque échantillon est défini par le nombre d'unités qu'il renferme par mg et par son activité globale. Ainsi lors de l'isolement de ce principe actif à l'état pur, il sera indispensable de choisir la matière première la plus riche. De plus, la détermination du nombre d'unités par mg de fractions permet de suivre l'enrichissement au cours des fractionnements successifs.

TROISIEME PARTIE

=====

PARTIE EXPERIMENTALE

SERUM HUMAIN

I N T R O D U C T I O N

=====

Notre travail consiste à isoler, dans un grand état de pureté, le composé sérique de nature protéique capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Le but est double : dans un premier temps, nous cherchons certes à définir les caractéristiques physicochimiques de ce facteur, mais en fonction de ces données, nous espérons pouvoir ensuite expliquer son rôle physiologique dans un intérêt thérapeutique.

Nous savons à la suite des travaux de LABORDE et coll. (51) que cette protéine est présente à un taux très faible dans le sérum humain normal. Or, dans la mesure où il nous faut préciser à chaque stade de fractionnement, l'enrichissement de l'échantillon en principe actif, sa composition électrophorétique et immunoélectrophorétique, il est indispensable de mener la préparation de ce produit à partir d'un volume important de matière première.

Le domaine des méthodes de caractérisation et de préparation s'est considérablement développé au cours de cette décennie.

A côté des méthodes classiques telles que le fractionnement par les solvants organiques, ou le relargage par les sels neutres, de nouvelles techniques apparaissent : la chromatographie sur gel polymérisé hydrophile, l'électrophorèse en veine liquide ou sur support inerte, l'électrofocalisation. Or si toutes ces techniques sont applicables à l'échelle préparative, certaines ne permettent pas la séparation des protéines à partir de plusieurs litres de sérum en une seule opération et aucune ne conduit directement à un produit pur. Il est donc nécessaire d'établir un protocole de fractionnement en fonction de cet impératif, et, tout en exploitant les possibilités de chacune de ces techniques, de les utiliser dans un ordre judicieux. A priori, il semble logique de commencer ce travail par des méthodes de précipitation (fractionnement de COHN, relargage par le sulfate d'ammonium), ce qui permet de traiter des volumes importants de matière première, et d'achever la purification par des méthodes plus fines.

A chaque stade, les protéines sont caractérisées par électrophorèse et immunoélectrophorèse. La haute spécificité et la grande sensibilité de la réaction immunologique permettent de suivre au mieux les différentes étapes de la purification. Par approches successives, nous pouvons ainsi établir une fiche des caractéristiques physico-chimiques de la protéine étudiée.

Le plus souvent, c'est par une étude systématique des protéines sériques par toutes les méthodes de caractérisation et de préparation qu'a été mise en évidence leur extrême hétérogénéité.

Lorsqu'une protéine est obtenue par un procédé différent de ceux déjà décrits, il suffit de comparer ses propriétés à celles de protéines connues. Soit elle est identifiée à l'une d'entre elles et on ne retient que son nouveau mode de préparation, soit elle en diffère, et elle prend alors place dans la suite de la classification. Les techniques étant de plus en plus sélectives, il n'est pas rare de découvrir une nouvelle protéine sérique dite mineure.

Sachant que l'histamine est captée par un composé sérique macromoléculaire de nature protéique, nous avons cherché à l'isoler en suivant cette activité spécifique au cours des différentes étapes de fractionnement. Les fractions inactives sont éliminées d'emblée et seul l'échantillon captant retient notre attention pour une étude plus approfondie et relativement plus facile.

Le protocole adopté lors de ce travail n'est pas définitif et sera sans doute remanié. Il devra tenir compte beaucoup plus des propriétés physico-chimiques alors connues que des problèmes de manutention, sans toutefois les ignorer complètement.

C H A P I T R E I

=====

FRACTIONNEMENT SELON LA METHODE DE COHN

Des études précédentes avaient permis de localiser dans la fraction II de COHN (PARROT et coll.,75), le composé capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Les auteurs avaient assimilé ce constituant protéique à une partie infime des immunoglobulines G.

A/ TECHNIQUE

Nous avons appliqué ce même mode de fractionnement à un mélange de plasmas. Trois fractions seulement sont retenues (voir partie technique, Chapitre I).

Les fractions I, II et III sont regroupées en un seul lot; concentrées, elles sont conservées à +4°C sous la forme d'une masse encore très hydratée. Le précipité IV et le précipité V riche en sérum albumine sont lyophilisés.

B/ RESULTATS

Les échantillons IV et V ne captent pas l'histamine; les trois premières fractions seules sont actives. 0,3 μ g de cette préparation correspondent à une unité. Si nous considérons qu'un millilitre de sérum humain normal renferme en moyenne 4.000 unités, l'enrichissement est certain (l'unité est définie dans la partie technique, Chapitre VII).

L'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse mettent en évidence une forte proportion d'immunoglobulines mais aussi des β_1 globulines, plusieurs α_1 et α_2 globulines et des traces non négligeables d'albumine (Figure 11).

Cette technique de fractionnement conduit à une préparation certes très enrichie en principe actif mais encore hétérogène. Il faut noter que les immunoglobulines administrées seules ou associées à l'histamine sont obtenues suivant ce procédé et qu'elles ne constituent pas une préparation absolument pure.

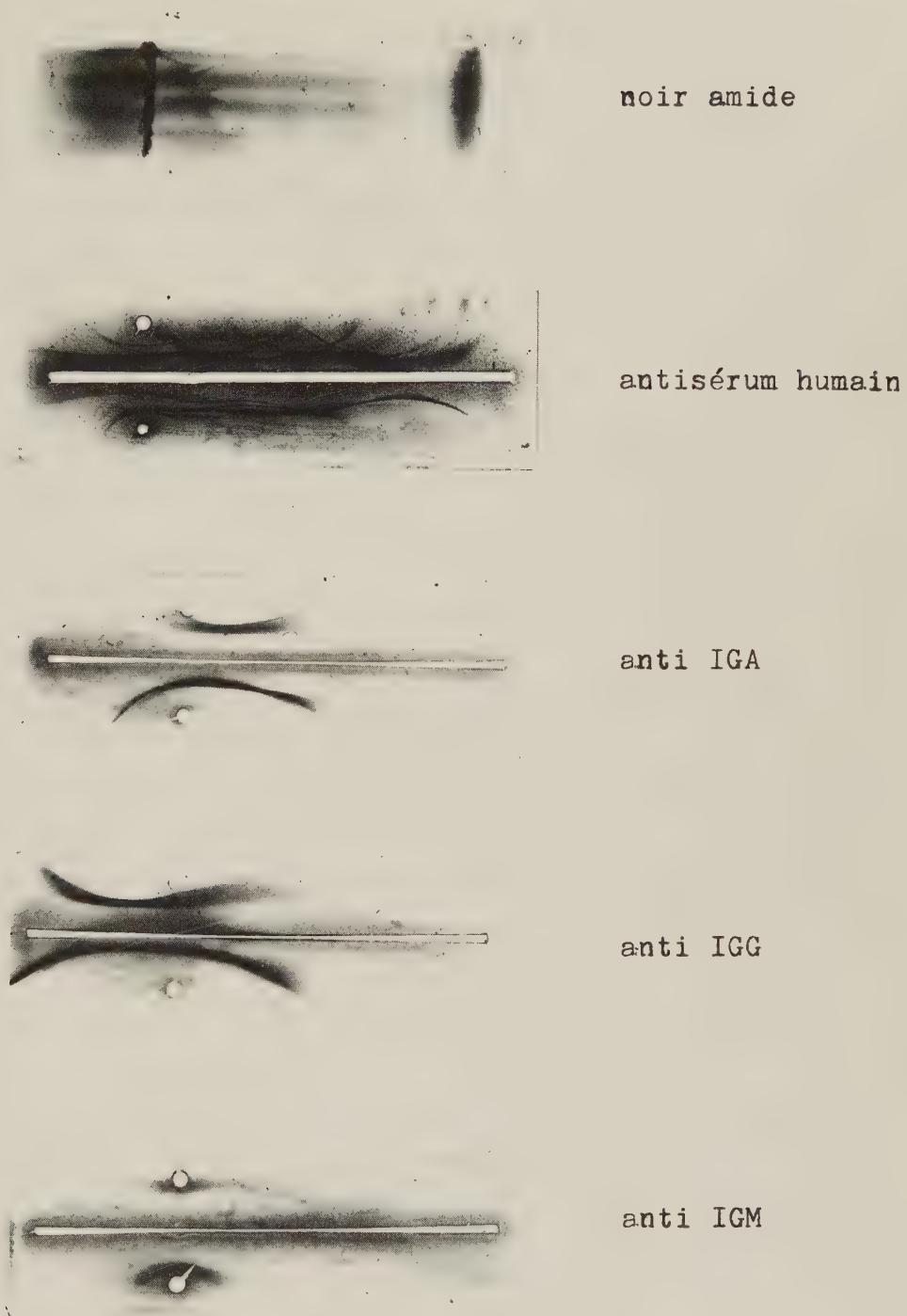


Figure 11 - ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET IMMUNOELECTROPHORETIQUE
DES FRACTIONS I, II et III de COHN.

C H A P I T R E I I

=====

FRACTIONNEMENT D'UN SERUM HUMAIN NORMAL PAR L'ACIDE PHYTIQUE

En respectant strictement les conditions opératoires, l'acide phytique précipite en totalité les immunoglobulines. Or, à la suite des travaux de LABAT (50), nous savons que le facteur histaminopexique est présent dans l'extrait phytique. Nous avons cherché à reproduire ces résultats dans le cadre d'une étude systématique des caractères de précipitation de ce facteur.

A/ TECHNIQUE

Nous opérons la précipitation dans un milieu contenant aussi peu de sels neutres que possible. Un volume de sérum humain normal dilué par trois volumes d'eau distillée est acidifié à pH 2,10 et traité par six volumes d'une solution 0,1 N d'acide phytique.

Après élimination du précipité par centrifugation, le surnageant est amené à pH 5, dialysé contre l'eau distillée fréquemment renouvelée, concentré et lyophilisé (voir partie technique, chapitre II). Une étude électrophorétique et immuno-électrophorétique nous permet de préciser la composition de l'extrait phytique obtenu. Nous étudions de plus son pouvoir d'inhiber l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

B/ RESULTATS

Le facteur capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye est bien présent dans la partie phytosoluble. 1mg d'extrait phytique renferme 3300 unités, (l'unité est définie dans la partie technique, chapitre VII). Il est dix fois plus actif que le sérum humain initial (Tableau III)

TABLEAU III

Activité comparée d'un sérum et de son extrait phytique

	x (μ g)	$1/x$ (U/mg de protéine)
Sérum humain normal	3	330
Extrait phytique	0,3	3300

x : poids de préparation contenant 1 unité

$1/x$: nombre d'unités par mg

Dans la mesure où ce facteur ne représente qu'une partie infime des protéines totaux, 4 à 7 pour 10.000 (LABORDE et coll.,51), on peut admettre que, malgré l'enrichissement observé les anticorps spécifiques ne peuvent pas encore le révéler. De plus, il faut admettre que ce facteur soit présent, à la différence de la plupart des immunoglobulines, dans la partie **phyto-soluble**.

A la suite de ce travail et malgré les arguments avancés, la nature gammaglobulinique du facteur étudié semble peu probable.

C H A P I T R E I I I

=====

RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Deux fractionnements par le sulfate d'ammonium ont été entrepris successivement sur deux échantillons :

- un mélange de 5 litres de sérum humain, dans un but préparatif. Cette matière première s'est avérée peu active par l'étude des dilutions limites.
- 90ml d'un sérum humain qui, beaucoup plus actif, a retenu notre attention pour une étude complémentaire.

I- RELARGAGE D'UN MELANGE DE SERUM

A/ Technique

5 litres de sérum humain normal dilués au demi par une solution de chlorure de sodium 0,8 pour 1000, sont soumis à un relargage par le sulfate d'ammonium.

En augmentant progressivement la concentration en sulfate d'ammonium et en isolant à chaque stade le précipité par centrifugation, nous obtenons cinq fractions (voir partie technique, chapitre III) :

- 1) précipitant à une concentration de 1,9M en sulfate d'ammonium à pH 7,0.
- 2) précipitée entre 1,9M et 2,3M à pH 7,0
- 3) précipitée entre 2,3M et 2,7M à pH 7,0
- 4) précipitée entre 2,7M et 3,4M à pH 5,0
- 5) soluble dans le sulfate d'ammonium 3,4M à pH 5,0

Chaque fraction est dissoute dans une solution de chlorure de sodium à 0,8 pour 1000, dialysée contre l'eau distillée, puis concentrée et lyophilisée. Sur chaque échantillon ainsi obtenu, nous effectuons des électrophorèses sur agarose et des analyses immunoélectrophorétiques avec un anti-sérum humain normal (735 Pasteur, RCO05 Boehringer) et des antisérums spécifiques anti IGG IGA IGM. Nous étudions enfin leur pouvoir de captation de l'histamine.

B/ Résultats

Seules les fractions précipitant par le sulfate d'ammonium entre 2,3 et 2,7M et 2,7M et 3,4M diminuent l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye. Par la technique des dilutions limites appliquée à ces deux fractions (partie technique, chapitre VII), nous localisons la plus grande activité dans la zone de relargage entre 2,3M et 2,7M en sulfate d'ammonium.

Leurs analyses électrophorétiques et immunoélectrophorétiques montrent la présence d'une quantité importante d'albumine, de deux α_2 globulines et de β_1 globulines (Figure 12)

Les fractions contenant les immunoglobulines et précipitées à une concentration 2,3M en sulfate d'ammonium sont sans activité biologique. Celles solubles à une concentration de 3,4M en sulfate d'ammonium et qui contiennent encore de l'albumine sont, elles aussi, inactives.

II- RELARGAGE DE 90ml D'UN SERUM

A/ Technique

Nous avons ensuite pratiqué un relargage plus fin sur 90ml de sérum humain très actif contenant dans la totalité de l'échantillon $4,3 \times 10^5$ unités afin d'obtenir quatre fractions au lieu de deux dans la zone active de relargage (voir partie technique, chapitre III).

- 1) la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 2,2M et 2,5M pH 7,0
- 2) la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 2,5M et 2,8M pH 7,0
- 3) la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 2,8M et 3,2M pH 7,0
- 4) la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 3,2M et 3,5M pH 7,0

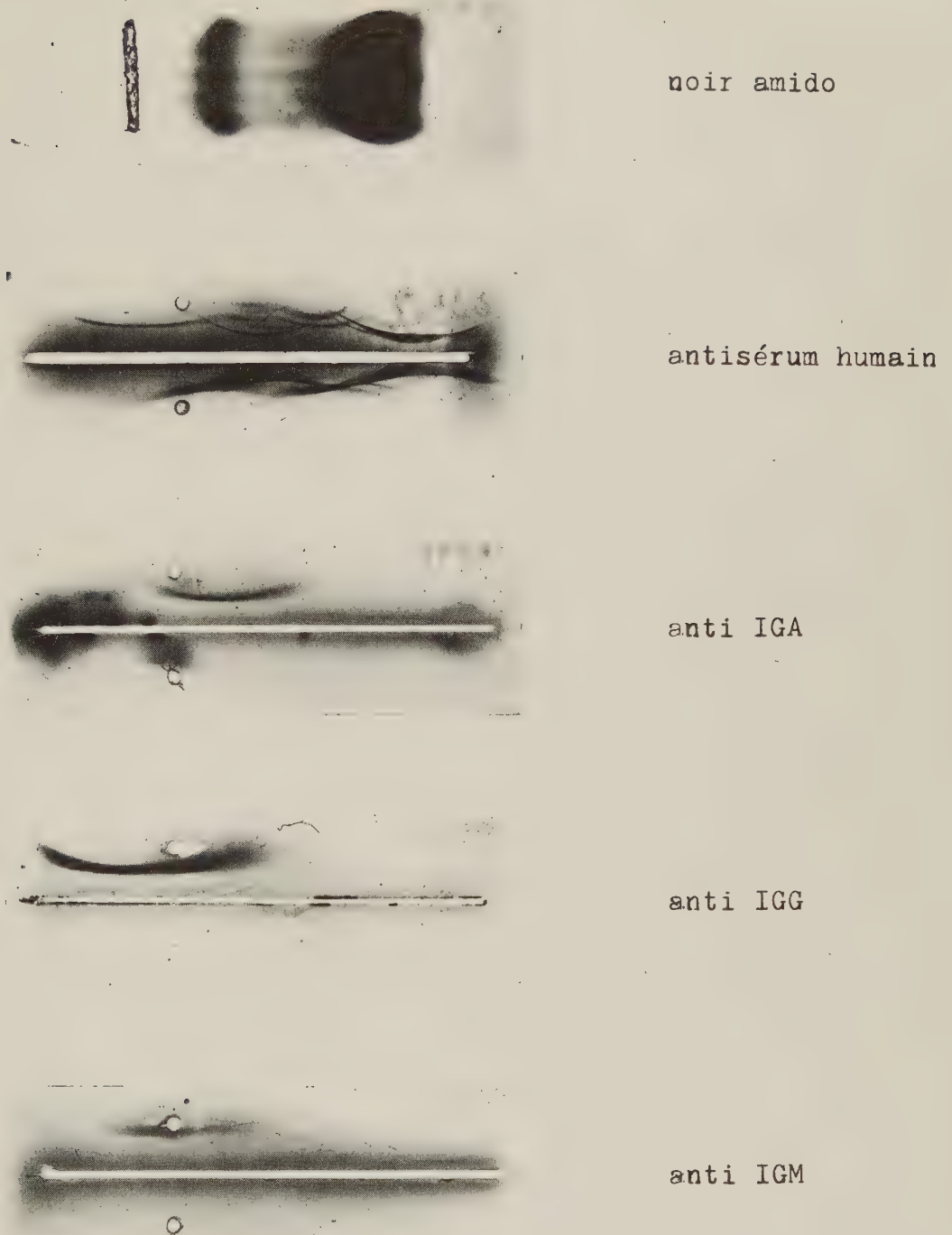


Fig. 12 - FRACTION ACTIVE PRECIPITEE par le SULFATE
D'AMMONIUM entre 2,5M et 2,8M à pH 7,0

B/ Résultats

Deux de ces fractions possèdent une activité, celle précipitant par le sulfate d'ammonium entre 2,5M et 2,8M contient 33×10^5 unités et celle précipitant entre 2,8M et 3,2M renferme $0,43 \times 10^5$ unités.

TABLEAU IV

Activité comparée de deux sérums
et de leurs fractions de relargage

	x (μ g)	1/x (U/ml ou U/mg)	P/x (U/fraction)
Sérum total	15	4750/ml	$4,3 \times 10^5$ (P=6,40g)
Surnageant de la précipitation par le sulfate d'ammonium 2,0M à pH 7,0	1,8	40000/ml	36×10^5 (P=6,40g)
Zone de relargage par le sulfate d'ammonium 2,5M à 2,8M à pH 7,0	0,3	3300/mg	33×10^5 (P = 1g)
2,8M à 3,2M à pH 7,0	3,0	330/mg	$0,43 \times 10^5$ (P = 0,130g)
Mélange de 5 litres de sérums humains			
Zone de relargage par le sulfate d'ammonium 2,3M à 2,7M à pH 7,0	8	125/mg	$7,5 \times 10^5$ (P = 6g)
2,7M à 3,4M à pH 7,0	15	66/mg	110×10^5 (P = 170g)

x : poids de préparation contenant une unité
P : poids total de la préparation
1/x : nombre d'unités par mg ou par ml
P/x : nombre d'unités par fraction

C/ Conclusion

Cette expérience permet de mieux préciser la zone de relargage par le sulfate d'ammonium du facteur protidique responsable de la diminution de l'activité biologique de l'histamine et de mettre en évidence un enrichissement relatif indiscutable. En effet, alors que le sérum initial contient une unité pour 15 μ g de protéines, les fractions actives renferment respectivement 1 unité pour 0,3 μ g et 3 μ g de préparation.

De plus, en calculant l'activité globale de chacun des échantillons, on constate que la somme des activités des deux échantillons est bien supérieure à celle de l'échantillon de sérum utilisé. Nous avons eu la surprise de ne pas mettre en évidence une perte prévisible au cours du fractionnement; on constate au contraire une augmentation considérable d'activité. Nous sommes passés d'un sérum renfermant $4,3 \times 10^5$ unités à deux fractions actives contenant au total, environ 33×10^5 unités.

Ceci nous amène à envisager :

- soit l'existence d'une combinaison de la molécule étudiée, avec une autre protéine pour donner une combinaison moins active,
- soit la libération de sites supplémentaires sur le facteur responsable,
- soit l'élimination d'un inhibiteur au cours du fractionnement

III- RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM A DEMI SATURATION DE SERUMS HUMAINS NORMAUX ET DE SERUMS D'ALLERGIQUES

Cette révélation par le sulfate d'ammonium d'une activité dissimulée dans le sérum a été confirmée par une série de relargages. Les différents sérums dilués au demi sont traités volume à volume par une solution saturée de sulfate d'ammonium. A chaque essai, nous avons retrouvé l'activité histaminopexique dans la fraction soluble à une concentration 2 M en sulfate d'ammonium et ceci avec une augmentation considérable de l'activité (AGNERAY et coll.,4).

Nous avons procédé parallèlement à la précipitation des immunoglobulines de sérums de sujets allergiques. La fraction soluble après précipitation par une solution de concentration 2 M en sulfate d'ammonium ne diminue pas l'activité contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Les sérums de sujets allergiques ne présentent donc aucune activité avant et après relargage. Il semble que le facteur protéique actif d'un sérum humain normal soit absent d'un sérum allergique (PARROT et coll.,74).

Le relargage ne fait pas apparaître une activité initialement dissimulée dans le sérum de sujets allergiques

IV- LAISE EN EVIDENCE DE LA LIBERATION D'HISTAMINE AU COURS DU RELARGAGE

A/ Technique

Parmi les différentes propositions avancées pour expliquer cette augmentation considérable d'activité, nous avons pensé au rôle que pouvait jouer l'histamine. Au cours du relargage, l'histamine liée peut être séparée de la protéine captante et libérée ainsi des sites supplémentaires. Pendant 24 heures, nous laissons en contact dans 10ml de liquide de TYRDE 150mg de la fraction précipitée entre 2,5M et 2,8M de concentration en sulfate d'ammonium et 100mg de dichlorhydrate d'histamine. Après dialyse de 48 heures, l'échantillon concentré puis lyophilisé est testé par la méthode pharmacologique. Rappelons que par cette technique, le chiffre 20 indique le pourcentage d'histamine dissimulée par un sérum humain normal.

TABEAU V

Activité comparée d'une fraction de relargage
avant et après incubation avec l'histamine

	x (μ g)	$1/x$ (U/mg)	P/x (P=150mg)
Zone de relargage par le sulfate d'ammonium 2,8 à 3,2M pH 7,0	0,3 μ g	3300	495.000
Même zone de relargage après incubation avec l'histamine	3 μ g	330	49.500

x : poids de préparation contenant 1 unité
 P : poids total de la préparation
 $1/x$: nombre d'unités par mg
 P/x : nombre d'unités par fraction

La préparation, après incubation en présence d'un excès d'histamine, ne renferme plus que 330 unités par mg : l'activité est dix fois plus faible (Tableau V). Lors des relargages de sérum, nous avons constaté que l'activité globale de la fraction précipitée était dix fois plus élevée que celle des sérums. Il semble donc que l'histamine soit libérée, au cours du relargage, des sites de fixation de la protéine captante.

Néanmoins l'échantillon obtenu, bien que moins actif, est encore capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Puisque l'histamine est introduite en excès dans le milieu, on admet que tout les sites de fixation de la protéine sont saturés et qu'un nouveau déplacement de l'histamine liée survient au cours de la dialyse de 48 heures. Il existerait peut-être deux types de sites de fixation : un site de liaison labile dont l'histamine se détache en cours de dialyse et un site de liaison plus solide qui n'est rompue que lors de traitements plus drastiques, comme le relargage par le sulfate d'ammonium. Ces observations rejoignent d'ailleurs les études de dialyse de sérums par PARROT et coll. (76). Une dialyse longue (1ml de sérum contre 150ml de solution de ClNa à 9 p.1000 changés 3 fois par 24 heures) augmente l'histaminopexie d'un sérum normal jusqu'à une valeur maximale de 50 p.100 atteinte le 6ème jour. Pour le sérum de malade allergique, une valeur positive d'histaminopexie apparaît seulement au bout de trois jours de dialyse et atteint la même valeur maximale de 50 p.100 mais seulement à partir du 9ème jour.

V- BILAN

Quoiqu'il en soit, ce facteur protéique capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye précipite à une concentration en sulfate d'ammonium bien différente de la zone de relargage par le sulfate d'ammonium des immunoglobulines G.

Ce fait est d'ailleurs confirmé par l'étude immuno-électrophorétique des fractions actives. Les immunosérums spécifiques anti IGG, IGA et IGM ne révèlent aucune des trois immunoglobulines (Figure 12). Ces résultats semblent s'opposer à ceux obtenus antérieurement (LABORDE et coll., 51)

Cependant, il faut noter que les immunoglobulines G préparées soit par la méthode de COHN, soit par la technique de DEUTSCH ne sont pas absolument pures (SCHULTZE et HEREMANS, 87) et peuvent très bien renfermer le facteur protéique actif.

Nous avons d'ailleurs procédé à l'étude immunoélectrophorétique des globulines utilisées en thérapeutique dans le traitement de certaines formes d'allergie (Figure 11). Les résultats sont comparables à ceux obtenus lors de l'étude des fractions I, II et III de COHN.

Les fractions actives obtenues lors du relargage de cinq litres de sérum humain sont soumises à d'autres méthodes de fractionnement dans le but de préparer un principe actif dans un grand état de pureté. Par suite de la faible teneur

de ce mélange de sérums en facteur capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye, le rendement final est très faible. Il était nécessaire d'entreprendre un nouveau fractionnement. Nous avons cherché à combiner les trois techniques de précipitation précédemment décrites.

C H A P I T R E I V

APPLICATION SUCCESSIVE

DES TROIS TECHNIQUES DE PRECIPITATION

Les fractions I, II et III de COHN nous ont été obligeamment procurées par le Centre de Transfusion Réanimation Jean JULLIARD, Laboratoire de Biochimie.

A/ TECHNIQUE

Deux kilogrammes des fractions I, II et III de COHN sont dissous dans 100 litres d'eau distillée. En augmentant progressivement la concentration en sulfate d'ammonium par addition de sel cristallisé (voir partie technique, Chapitre III), nous obtenons six fractions :

- 1) précipitant à une concentration de 1,0 M en sulfate d'ammonium à pH 7,0
- 2) précipitée entre 1,0 M et 1,8 M à pH 7,0
- 3) précipitée entre 1,8 M et 2,0 M à pH 7,0
- 4) précipitée entre 2,0 M et 2,5 M à pH 7,0
- 5) précipitée entre 2,5 M et 3,2 M à pH 7,0
- 6) précipitée entre 3,2 M et 3,5 M à pH 3,5

La fraction précipitée entre 2,5 M et 3,2 M est dissoute dans deux litres d'une solution de chlorure de sodium à 0,8 p. 1000 et dialysée contre l'eau distillée fréquemment renouvelée. Il est nécessaire d'éliminer en grande partie le sulfate d'ammonium puisque AGNERAY (1) a montré que la précipitation de la sérumalbumine et des immunoglobulines par l'acide phytique est partiellement inhibée en présence d'une concentration trop élevée en ion NH_4^+ dans le milieu.

Après concentration et détermination du taux de protides par la méthode du biuret, nous obtenons 160ml de solution à 65g de protides par litre. Cette solution est diluée dans 480ml d'eau distillée, acidifiée à pH 2,10 et traitée par 980 ml de solution d'acide phytique 0,1 N.

Après quelques heures de contact, le surnageant est isolé par centrifugation du précipité, dialysé, concentré et lyophilisé. Nous étudions la composition électrophorétique et immunoélectrophorétique de l'extrait phytique obtenu et son pouvoir de dissimuler l'activité biologique de l'histamine.

B/ RESULTATS

L'extrait phytique préparé dans ces conditions est actif. L'étude des dilutions successives nous permet d'apprécier l'enrichissement de la fraction en principe actif. 1mg d'extrait phytique renferme 50.000 unités. Si nous comparons ce résultat à celui des deux fractions actives du relargage de 5 litres de sérum humain, nous constatons un enrichissement considérable (Tableau VI).

Un sérum humain normal traité successivement par ces trois techniques donne un échantillon peu important, très actif et privé des protéines majeures du sérum.

TABLEAU VI

Intérêt de l'application successive
de trois techniques de précipitation

	x (μ g)	$1/x$ (U/mg)	P/x
Zone de relargage par le sulfate d'ammonium			
2,3M à 2,7M pH 7,0	8	125	$7,5 \times 10^5$ $P = 6g$
2,7M à 3,4M pH 7,0	15	66	110×10^5 $P = 170g$
Extrait phytique	0,02	50.000	500×10^5 $P = 1g$

x : poids de préparation contenant 1 unité
 P : poids total de la préparation
 $1/x$: nombre d'unités par mg
 $1'/x$: nombre d'unités par fraction

C H A P I T R E V

=====

CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION

SUR GEL POLYMERISE HYDROPHILE

Par chromatographie de filtration sur Sephadex G 200, les protéines sont séparées en fonction de leur volume moléculaire, c'est-à-dire en première approximation suivant leur poids moléculaire.

I- CHROMATOGRAPHIE D'UN SERUM HUMAIN

A/ Technique

140ml de sérum humain sont fractionnés sur gel de Sephadex G 200 dans une colonne de 2 mètres de hauteur et de 5 centimètres de diamètre, équilibrée en tampon Tris 0,1 M, NaCl 1 M de pH 8,0 (voir partie technique, chapitre IV).

La mesure de la densité optique à 280nm de l'éluat recueilli dans un collecteur de fractions révèle trois clochers. Nous regroupons l'éluat en cinq fractions correspondant à chacun des clochers et aux deux zones comprises entre les premier et deuxième pics et les deuxième et troisième pics.

Sur ces fractions dialysées contre l'eau distillée puis concentrées et lyophilisées, nous étudions le pouvoir de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

B/ Résultats

Les fractions actives correspondent à la partie ascendante du deuxième pic; leur volume d'élution est légèrement inférieur à celui des globulines de constante de sédimentation 7 S (Figure 13).

II- CHROMATOGRAPHIE DE 10ml DE SERUM HUMAIN

A/ Technique

Pour mieux préciser le rapport V_e/V_o de la zone active, nous avons entrepris une deuxième chromatographie sur Sephadex G 200 de 10ml de sérum dans une colonne de 1 mètre de hauteur et de 5 centimètres de diamètre. Le regroupement des fractions de 5ml en fonction du tracé obtenu par enregistrement de l'éluat à 280nm est beaucoup plus fin que lors de la chromatographie précédente.

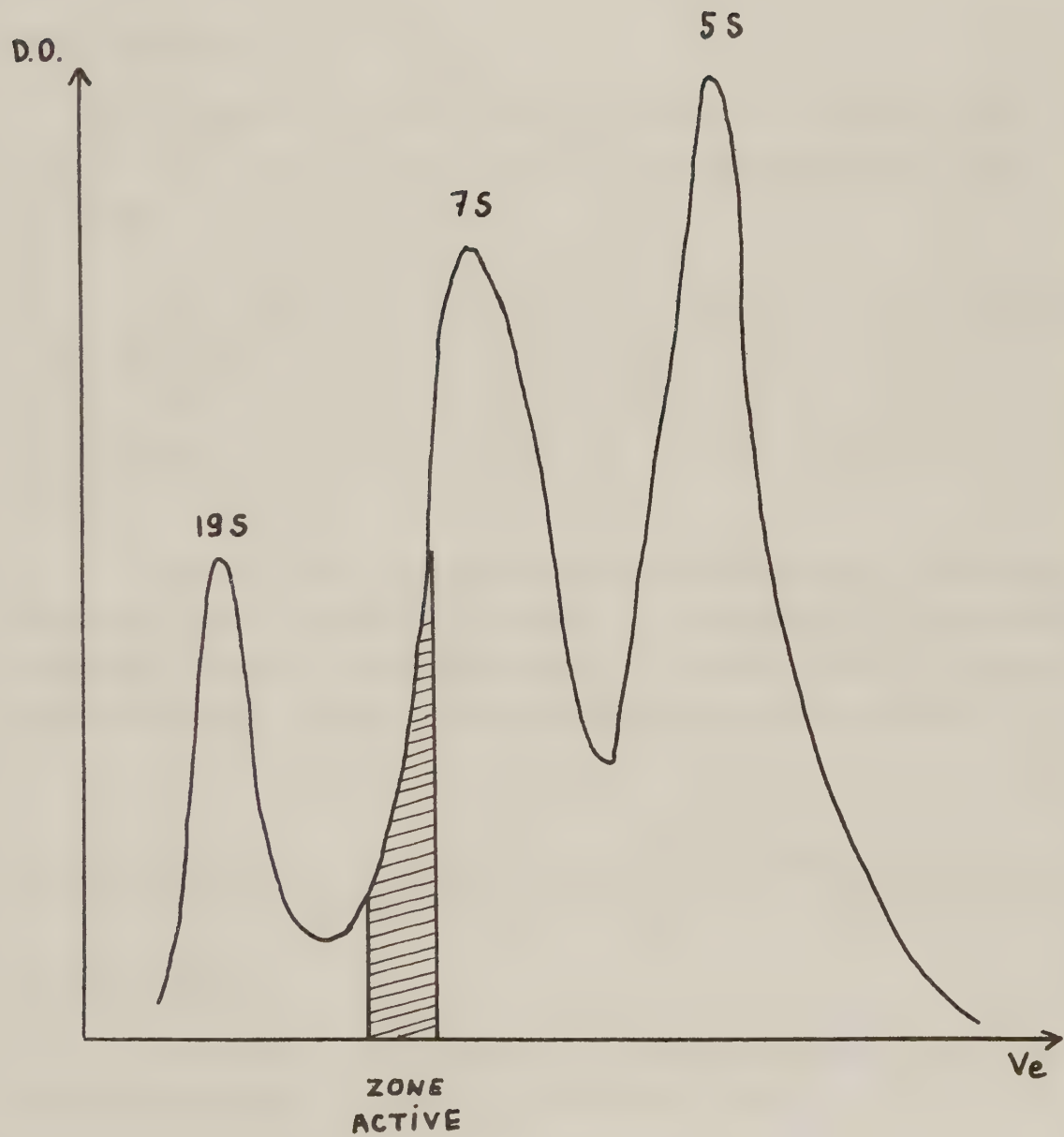


Fig.13 - CHROMATOGRAPHIE sur gel de SEPHADEX G 200
d'un SERUM HUMAIN NORMAL

Les échantillons obtenus après dialyse, concentration et lyophilisation sont soumis à une analyse électrophorétique sur agarose et immunoélectrophorétique avec un antisérum normal (737 Pasteur, RCOO 5 Boehringer) et des antisérums spécifiques IGG, IGA et IGM.

B/ Résultats

Le rapport V_e/V_o des fractions actives se situe entre 1,30 et 1,58 alors que le rapport V_e/V_o des immunoglobulines IGG est compris entre 1,46 et 1,76.

Ces fractions renferment des composés macromoléculaires (IGM), des constituants de constante de sédimentation 7 S et en particulier des immunoglobulines IGG mais ne contiennent ni albumine, ni transferrine dont le rapport V_e/V_o est de l'ordre de 1,90.

Or les fractions actives du relargage par le sulfate d'ammonium sont riches en albumine et transferrine qui, ayant un volume d'élution fort différent du volume d'élution du facteur protéique actif, peuvent être éliminées par ce procédé.

III- CHROMATOGRAPHIE DES FRACTIONS ACTIVES OBTENUES PAR RELARGAGE

A/ Technique

Nous avons donc procédé à la chromatographie sur Sephadex G 200 des échantillons actifs précipitant entre 2,3 et 3,4 M en

sulfate d'ammonium, sur des colonnes de 2 mètres de hauteur et 7,5cm de diamètre. Nous opérons le regroupement de l'éluat en fonction de son tracé obtenu par enregistrement continu à 280nm et en tenant compte du volume d'élution des fractions recueillies sur le collecteur.

Dialysés contre l'eau distillée, concentrés et lyophilisés, les échantillons sont soumis au test pharmacologique. Nous effectuons des immunoélectrophorèses contre un antisérum humain normal (737 Pasteur, RCOO 5 Boehringer), des antisérums spécifiques IGG, IGA et IGM (Pasteur) et un sérum de Lapin immunisé contre un extrait phytique de sérum humain.

B/ Résultats

Le rapport V_e/V_o est identique à celui des fractions obtenues par chromatographie d'un sérum.

Les constituants identifiés en électrophorèse et immuno-électrophorèse sont moins nombreux. Nous notons l'absence totale d'immunoglobulines IGM, IGA, IGG et d'albumine. Les immunsérums antisérum humain et anti-extrait phytique de sérum humain révèlent un arc à double courbure : l'un de mobilité β_1 et l'autre de mobilité albuminique (PARROT et coll., 70).

Il faut remarquer là un fait très intéressant, à savoir la similitude des deux composés révélés par ces deux immunsérums (Figure 14).

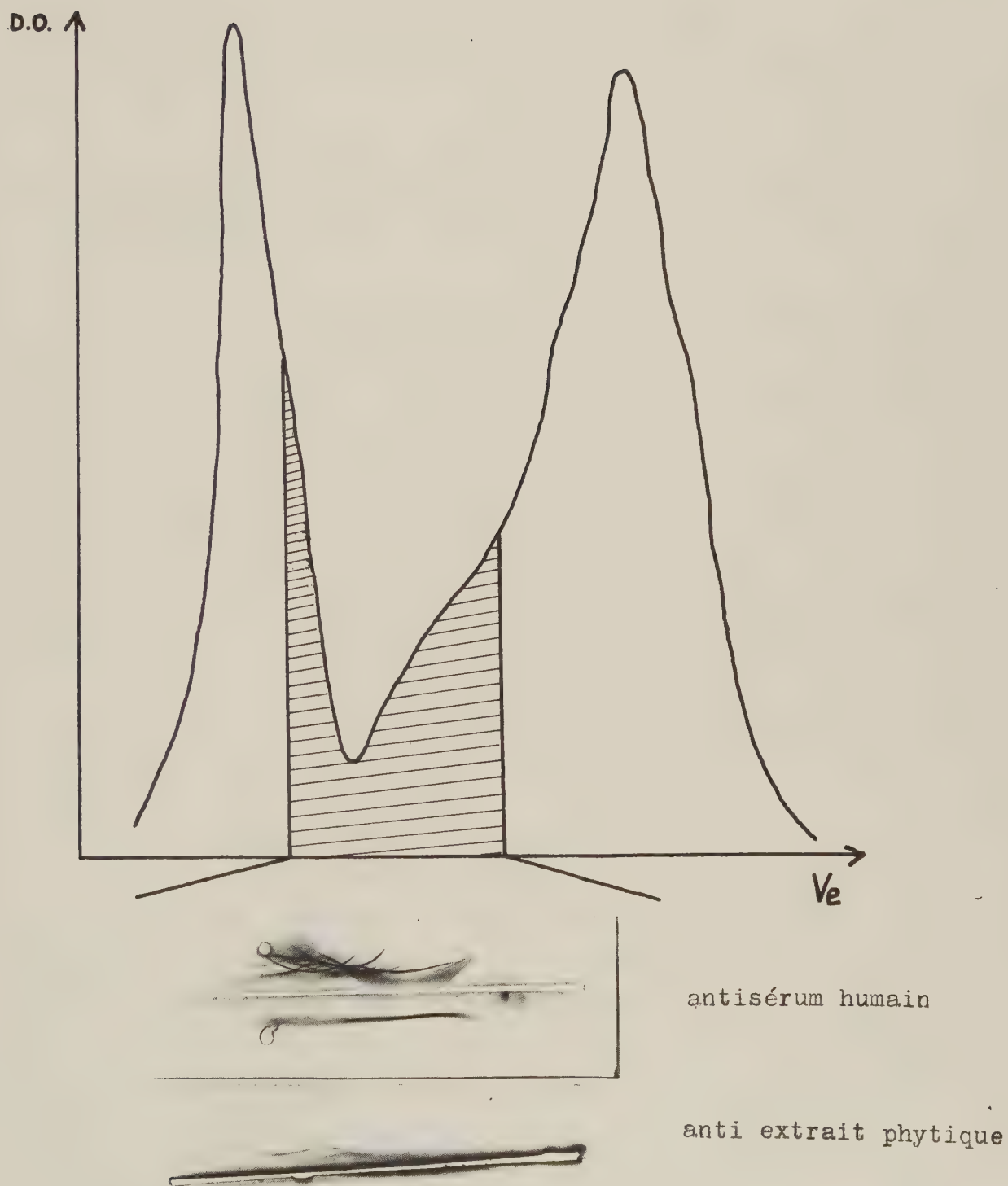


Fig.14 - CHROMATOGRAPHIE sur gel de SEPHADEX G 200 de la FRACTION précipitée par le SULFATE D'AMMONIUM ENTRE 2,5M et 2,8M à pH 7,0.

Ceci rejoint à nouveau les travaux de LABAT et collaborateurs (50) qui localisent le facteur protéique capable de fixer l'histamine dans l'extrait phytique d'un sérum humain et non dans la combinaison de l'acide phytique avec les protéines.

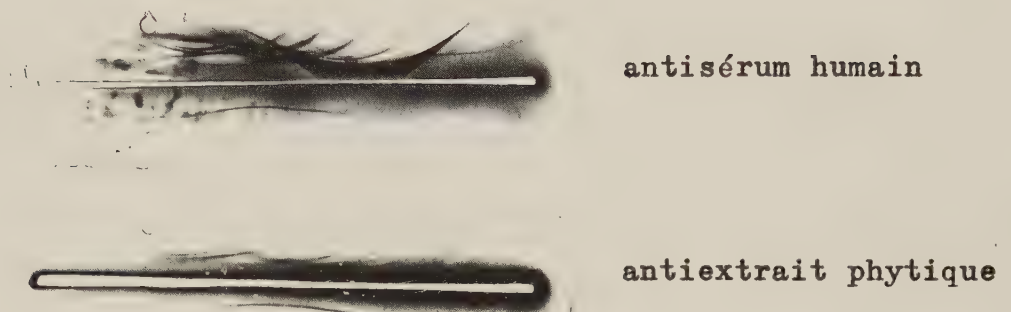
IV- CHROMATOGRAPHIE D'UN EXTRAIT PHYTIQUE PREPARE A PARTIR DE 10ml DE SERUM HUMAIN

Cet extrait phytique (voir partie technique, Chapitre II) après dialyse, concentration et lyophilisation est fractionné sur Sephadex G 200 dans une colonne de 1,50m de hauteur et de 1,2cm de diamètre. Le regroupement de l'éluat est réalisé en fonction des fractions recueillies dans le collecteur. Les fractions sont soumises aux essais habituels. Le rapport V_e/V_o de la fraction active se situe entre 1,25 et 1,50. Son analyse immunoélectrophorétique met en évidence un arc à double courbures l'un de mobilité α_1 , l'autre de mobilité α_2 (Figure 15).

Les fractions actives de chromatographie sur Sephadex G 200 d'un extrait phytique et d'une fraction active de relargage ne diffèrent que par la mobilité d'un des deux arcs.

L'aspect de cet arc à double courbure est à rapprocher de celui observé lors de l'étude du polymorphisme des globulines Gc (SCHULTZE et HEREMANS, 88). L'immunoélectrophorèse d'un sérum de sujet hétérozygote pour les globulines Gc révèle 2 arcs, l'un de mobilité α_1 , l'autre de mobilité α_2 qui se rejoignent pour former une seule ligne de précipitation à double courbure;

EXTRAIT PHYTIQUE de sérum humain normal



Fraction active de RELARGAGE par le
sulfate d'ammonium

antisérum humain



antiextrait phytique



Fig.15 - ETUDE IMMUNOELECTROPHORETIQUE des fractions actives de chromatographie sur gel de SEPHADEX G 200 d'un EXTRAIT PHYTIQUE et d'une fraction active de RELARGAGE par le SULFATE D'AMMONIUM d'un sérum humain normal.

ceci correspond au phénotype Gc 2-1. Les sérums des sujets homozygotes ne donnent qu'un arc de précipitation de mobilité α_1 pour le phénotype Gc 1-1 de mobilité α_2 pour le phénotype Gc 2-2.

Il peut s'agir également :

- soit de deux entités chimiques possédant un caractère antigénique commun,
- soit d'une protéine de migration rapide et d'une combinaison de cette protéine avec l'histamine migrant plus lentement.

Ceci est très hypothétique, mais la localisation de la radioactivité après migration électrophorétique de l'histamine marquée et d'une combinaison protéine-histamine marquée, permettrait peut-être de résoudre ce problème. Ces expériences sont en cours.

V- CHROMATOGRAPHIE DE L'EXTRAIT PHYTIQUE PREPARE A PARTIR
DES FRACTIONS I, II et III DE COHN

A/ Technique

Un gramme de cet extrait phytique (voir partie expérimentale, chapitre II) est fractionné par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200 dans une colonne de 1 mètre de hauteur et de cinq centimètres de diamètre. L'éluat recueilli dans un collecteur de fractions est regroupé d'après le rapport V_e/V_o de la zone active déterminé lors des essais précédents. Il est donc nécessaire de connaître le volume mort de la colonne utilisée dans cette expérience par mesure du volume d'élution d'une solution de bleu dextran 2.000.

Après dialyse, concentration et lyophilisation, les fractions obtenues sont soumises au test pharmacologique habituel.

B/ Résultats

L'activité se retrouve bien dans la fraction de rapport V_e/V_o compris entre 1,30 et 1,58. Les techniques de précipitation mises en oeuvre successivement n'ont pas entraîné de variation de poids moléculaire de la protéine capable de fixer l'histamine.

VI- BILAN

De nombreux auteurs avaient déjà annoncé la nature macromoléculaire et protéique du facteur sérique capable de dissimuler l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye. Trois séries de travaux ont été entreprises sur gel de Sephadex. GUIRGUIS (40) sur Sephadex G 200, puis GESCE et coll. (37) sur Sephadex G 25, ont précisé la nature du facteur histaminopexique en déterminant son activité sur le test pharmacologique lui-même. CERHOVA et CERNIK (19), par chromatographie sur Sephadex G 25 d'un mélange d'histamine et de sérum humain normal, ont montré par dosage chimique qu'une partie de l'histamine était éluée avec les protéines. Reprenons plus en détail ces travaux :

GESCE et coll. identifient ce facteur sérique non pas à une macromolécule mais à un polypeptide. Si nous étudions plus à fond leurs conditions opératoires, leurs conclusions ne sont pas acceptables. Avec un volume total de gel de Sephadex G 25 d'environ 400ml, les protéines doivent être exclues après élution d'un volume d'environ 120ml. Or ces auteurs, après passage d'un tel volume, identifient non pas les protéines mais les polypeptides qui, dans de bonnes conditions, sont élués plus tardivement.

CERHOVA et CERNIK, dans des conditions techniques beaucoup plus rigoureuses, attestent de la nature macromoléculaire du composé histaminopexique. Par chromatographie sur gel de Sephadex G 25 d'un mélange d'histamine et de sérum humain normal

ils déterminent la quantité d'histamine liée à la protéine et proposent de différencier les sérums des sujets sains des sérums des sujets allergiques par cette méthode.

GUIRGUIS enfin a cherché à préciser certaines caractéristiques physicochimiques de cette protéine. Les résultats qu'il obtient sur Sephadex G 200 ne sont pas du tout en accord avec les nôtres. Il conteste certes la nature gamma globulinique de la protéine captante mais il l'assimile à une protéine de constante de sédimentation 5 S. Les protocoles opératoires établis par cet auteur et dans notre laboratoire sont comparables, excepté le débit de l'éluat. Le faible débit observé conduit à une diffusion des clochers, ce que le tracé de la densité optique de l'éluat à 280 nm met bien en évidence.

Le seul argument que nous avançons pour définir avec certitude la zone d'élution de la protéine étudiée par chromatographie sur gel de Sephadex G 200 est le nombre de manipulations exécutées. Nous avons réalisé plus de vingt chromatographies, dans des colonnes de dimensions très variables, de sérum, d'extraits phytiques, de fractions actives de relargage. Nous avons toujours recherché, par le test pharmacologique, l'activité de toutes les fractions de chaque chromatographie. Dans cette étude systématique, nous n'avons jamais observé de changement du rapport V_e/V_o annoncé. Nous pourrions éventuellement assimiler ce facteur histaminopexique à une substance fortement liée aux protéines et que les différentes techniques de fractionnement ne pourraient détacher. Cette hypothèse est peu vraisemblable mais ne doit pas être rejetée.

Des résultats précédents, nous pouvons tirer quelques points essentiels:

- a) La protéine captante présente un poids moléculaire voisin des immunoglobulines G.
- b) Ce facteur n'est pas une immunoglobuline G puisqu'il précipite à une concentration en sulfate d'ammonium bien différente de la zone de relargage par ce sel des immunoglobulines G.
- c) Le rapport V_e/V_o déterminé par chromatographie du sérum demeure identique après chromatographie de la fraction active de relargage. La précipitation de ce facteur par le sulfate d'ammonium n'a donc pas entraîné de variation notable de poids moléculaire.
- d) Tout en permettant une détermination approximative du poids moléculaire, la chromatographie sur Sephadex G 200 conduit à l'obtention d'une fraction privée des protéines de constante de sédimentation 5 S et notamment de l'albumine, constituant en quantité non négligeable dans la fraction active de relargage. C'est ainsi que de 125 unités par mg de poudre de relargage, nous passons à 50.000 unités par mg de produit issu de chromatographie.

Le relargage par le sulfate d'ammonium suivi d'une chromatographie sur gel de Sephadex G 200 nous conduit à un produit très actif et très purifié.

A ce stade, le produit actif obtenu ne révèle que deux arcs de mobilité électrophorétique différente. Nous pouvons alors envisager une séparation de ces deux composés par électrophorèse de zone en gradient de densité.

C H A P I T R E V I

=====

ELECTROPHORESE DE ZONE EN GRADIENT DE DENSITE

Lors des fractionnements précédents, la composition en protéines de la préparation active obtenue est déterminée par électrophorèse sur support gélifié. Cette technique de séparation des protéines basée sur leur caractère amphotère, peut nous apporter une nouvelle donnée sur la mobilité électrophorétique du principe actif étudié et surtout s'incorporer dans notre plan de fractionnement. Mais si l'électrophorèse sur acétate de cellulose ou agarose permet une étude qualitative de l'échantillon, elle n'est applicable qu'à l'échelle analytique. Dans un but préparatif, seule l'électrophorèse sur support inerte ou en veine liquide est réalisable. Nous avons essentiellement travaillé en veine liquide, les protéines étant stabilisées dans leur zone de migration par un gradient de densité.

I- ELECTROPHORESE D'UN SERUM HUMAIN NORMAL

A/ Technique

Nous avons étudié le comportement électrophorétique de quatre sérums humains normaux dans l'appareil LKB 3340 C. L'expérience décrite ci-dessous est réalisée avec un sérum lyophilisé.

Un échantillon de 100mg de sérum lyophilisé est dialysé pendant 24 heures contre la solution tampon R_1 et amené à la densité de la zone de dépôt par addition de saccharose ou de solution de forte densité R_4 (voir partie technique, Chapitre V).

Le gradient de densité est réalisé par le système à 3 flacons.

Il constitue la veine liquide de la colonne de migration et s'insère ainsi entre la solution R_1 du compartiment cathodique et la solution de forte densité R_4 du compartiment anodique.

Après avoir déposé la prise d'essai dans la partie supérieure de la colonne, une différence de potentiel de 480 volts est appliquée pendant 16 heures.

La figure 16 obtenue par enregistrement de la densité optique de l'éluat à 280nm illustre le résultat de cette séparation. Nous obtenons cinq fractions. Elles sont dialysées contre l'eau distillée et lyophilisées.

B/Résultats

Dans tous les cas étudiés, l'activité se retrouve dans le clocher obtenu dès le début de l'élution. Il correspond à un volume d'environ 50ml. Cette fraction anodique est immédiatement suivie d'un pic présentant une très forte absorption à 280nm très riche en albumine.

La capacité de diminuer l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye peut donc être attribuée à une protéine de mobilité préalbuminique en électrophorèse en veine liquide.

L'étude des dilutions du sérum initial et de la fraction active d'électrophorèse permet d'apprécier l'enrichissement obtenu. Il est considérable puisque de 330 unités par mg de sérum lyophilisé, nous passons à 100.000 unités par mg de poudre lyophilisée après électrophorèse. Dans aucune autre technique de fractionnement, nous n'avions observé un tel enrichissement. Il est certain que, par suite de la position préalbuminique de ce facteur, ce procédé électrophorétique élimine toutes les protéines majeures du sérum.

De plus, nous constatons que l'activité globale de la fraction active est bien supérieure à celle du sérum initial (Tableau VII).

100mg de sérum lyophilisé contenant $0,33 \times 10^5$ unités conduisent à un échantillon de 10mg renfermant 10^6 unités.

L'échantillon purifié obtenu après électrophorèse est trente fois plus actif que la totalité de la prise d'essai initiale

TABEAU VII

Activité comparée d'un sérum et de la fraction préalbuminique obtenue par électrophorèse en gradient de densité

	x (μ g)	$1/x$ (U/mg)	P/x
Sérum initial	3	330	$0,33 \times 10^5$
Fraction préalbuminique 0,01		100.000	10^6

x : poids de préparation contenant 1 unité

P : poids total de la préparation

$1/x$: nombre d'unités par mg

P/x : nombre d'unités par fraction

Les hypothèses avancées lors de la constatation d'un phénomène identique en cours de relargage restent les mêmes. Le rôle de l'histamine est probable mais n'est peut-être pas le seul facteur en cause. Des études complémentaires doivent être menées sur les fractions actives de relargage et d'électrophorèse pour mieux expliquer cette augmentation considérable d'activité.

II- ELECTROPHORESE DE LA FRACTION ACTIVE OBTENUE SUR GEL DE

SEPHADEX G 200

A/ Technique

150 à 200mg de poudre lyophilisée représentent la prise d'essai maximale qui peut être traitée en une seule opération. De ce fait, six électrophorèses consécutives ont été nécessaires pour traiter la totalité de l'échantillon actif obtenu après relargage par le sulfate d'ammonium et par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200.

Après avoir établi le gradient de densité et introduit la prise d'essai dans l'appareil, une différence de potentiel de 550 volts est appliquée pendant 16 heures.

L'enregistrement de l'éluat à 280nm montre deux cloches l'un de mobilité préalbuminique, l'autre de mobilité β globulinique (Figure 16).

B/ Résultats

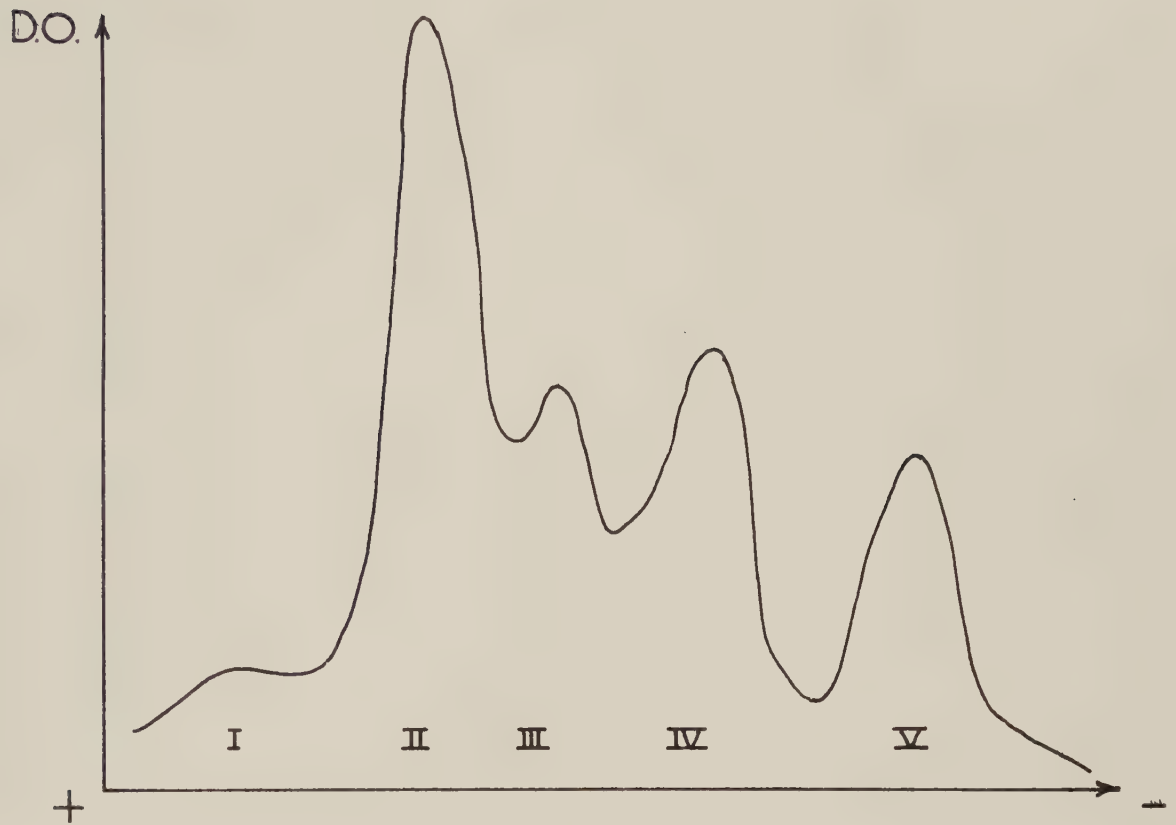
Seule la fraction de mobilité anodique diminue l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Cette fraction, après électrophorèse sur acétate de cellulose et coloration par le Noir amide présente une mobilité préalbuminique. L'immunoélectrophorèse contre un immunosérum antisérum humain normal révèle un seul arc de même mobilité.

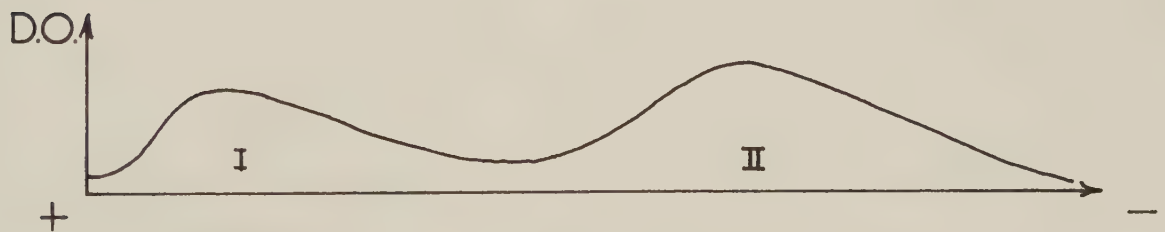
Le deuxième clocher, inactif renferme une protéine de mobilité β_1 globulinique quel que soit le support gélifié utilisé.

L'arc à double courbure observé lors de l'étude de la fraction active obtenue par chromatographie sur Sephadex G 200 est donc dédoublé par électrophorèse sous haute tension. Parmi les explications proposées pour interpréter ce phénomène, nous avons évoqué la possibilité d'un allélomorphisme. Celui-ci semble peu probable.

SERUM HUMAIN NORMAL



FRACTION ACTIVE OBTENUE par CHROMATOGRAPHIE sur GEL DE SEPHADEX G 200



antisérum
humain

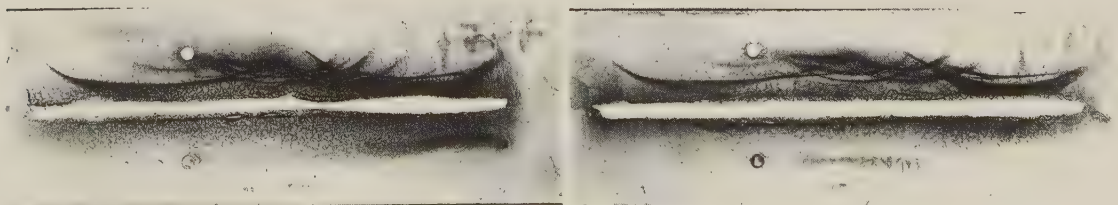


Fig.16 - ELECTROPHORESE DE ZONE en GRADIENT DE DENSITE

Pour accepter cette hypothèse, il faudrait admettre qu'un haut voltage provoque une séparation des deux protéines et que seule la fraction de mobilité préalbuminique présente une activité. Or l'activité pharmacologique devrait se retrouver dans les deux fractions.

III- BILAN

Ce facteur capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye, présente un comportement électrophorétique identique en veine liquide ou sur un support gélifié, comme l'acétate de cellulose ou l'agarose. En tampon alcalin, il se comporte comme une protéine de mobilité préalbuminique.

Cette séparation électrophorétique nous apporte, bien sûr, une donnée supplémentaire pour l'établissement d'une fiche de caractères physicochimiques de la protéine étudiée. De plus, elle présente un intérêt indéniable dans notre plan de fractionnement puisque d'une préparation déjà très purifiée elle fournit une fraction active ne donnant plus qu'un seul arc de précipitation en immunoélectrophorèse. Il est néanmoins certain que ce type d'électrophorèse ne peut être utilisé qu'en fin de fractionnement puisque nous ne pouvons guère le pratiquer sur plus de 200mg de prise d'essai par opération.

C H A P I T R E V I I

=====

ELECTROFOCALISATION

Une simple détermination de la distance de migration électrophorétique d'une protéine sur un support donné ne nous permet pas d'évaluer son point isoélectrique. L'orosomucoïde, par exemple, présente une mobilité α_1 sur papier ou acétate de cellulose et une mobilité albuminique sur agarose alors qu'il possède un point isoélectrique de 2,9. Néanmoins, par suite de la grande mobilité de la protéine étudiée, nous pouvons choisir avec certitude une zone de pH entre 3,0 et 5,0 dans laquelle elle migre et se focalisera à son point isoélectrique.

I- A/ TECHNIQUE

Une première séparation isoélectrique est menée à l'échelle analytique dans l'appareil LKB 8101.

Nous opérons dans les conditions décrites à la partie technique, Chapitre VI.

La prise d'essai correspond à 20mg de l'échantillon actif obtenu par électrophorèse en gradient de densité.

Une différence de potentiel de 240 volts et une intensité de 8 mA sont appliquées pendant 72 heures.

Après enregistrement simultané de la densité optique à 280 nm et à 260 nm, le pH de chaque tube d'élution est mesuré. Trois fractions sont retenues en fonction du tracé électrophorétique et du pH (Figure 17).

Il est nécessaire de séparer les amino acides et le saccharose, des protéines par chromatographie de chaque fraction sur Sephadex G 25. Connaissant le volume d'élution d'une macromolécule pour une colonne de Sephadex G 25, il nous est possible d'isoler précisément la partie protéique de chaque échantillon et de vérifier éventuellement si tel clocher obtenu après électrofocalisation est dû à l'absorption d'une protéine ou à un artefact provoqué par l'ampholine. La figure 18 illustre ces résultats. Le pic C ne renferme pas de protéines. La densité optique enregistrée est due à l'absorption des Ampholines et du saccharose présents dans le milieu, il faut d'ailleurs noter une absorption plus forte à 260 nm qu'à 280 nm.

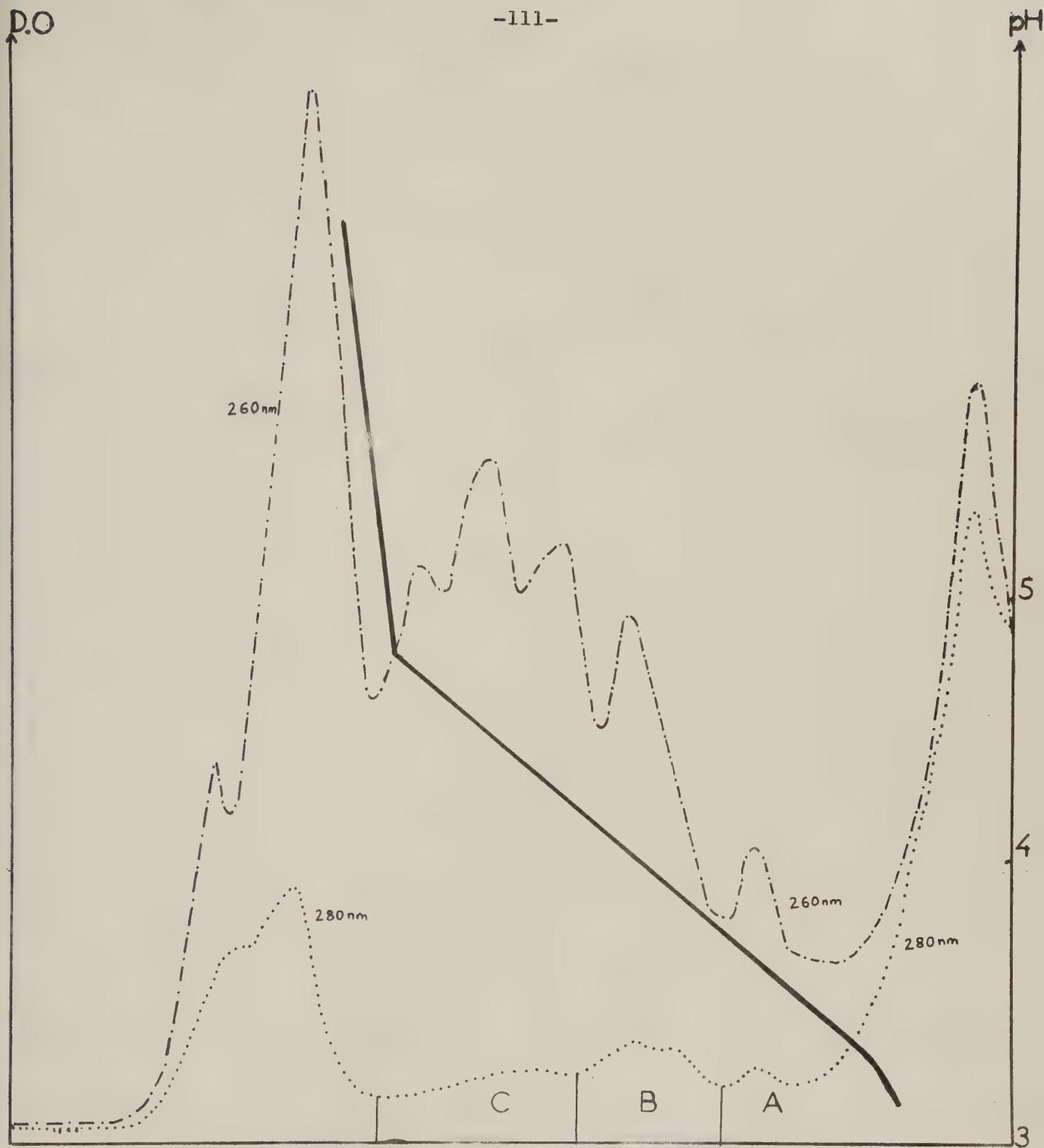


Fig.17 - ELECTROFOCALISATION de la FRACTION ACTIVE obtenue par ELECTROPHORESE en GRADIENT DE DENSITE (sérum humain)

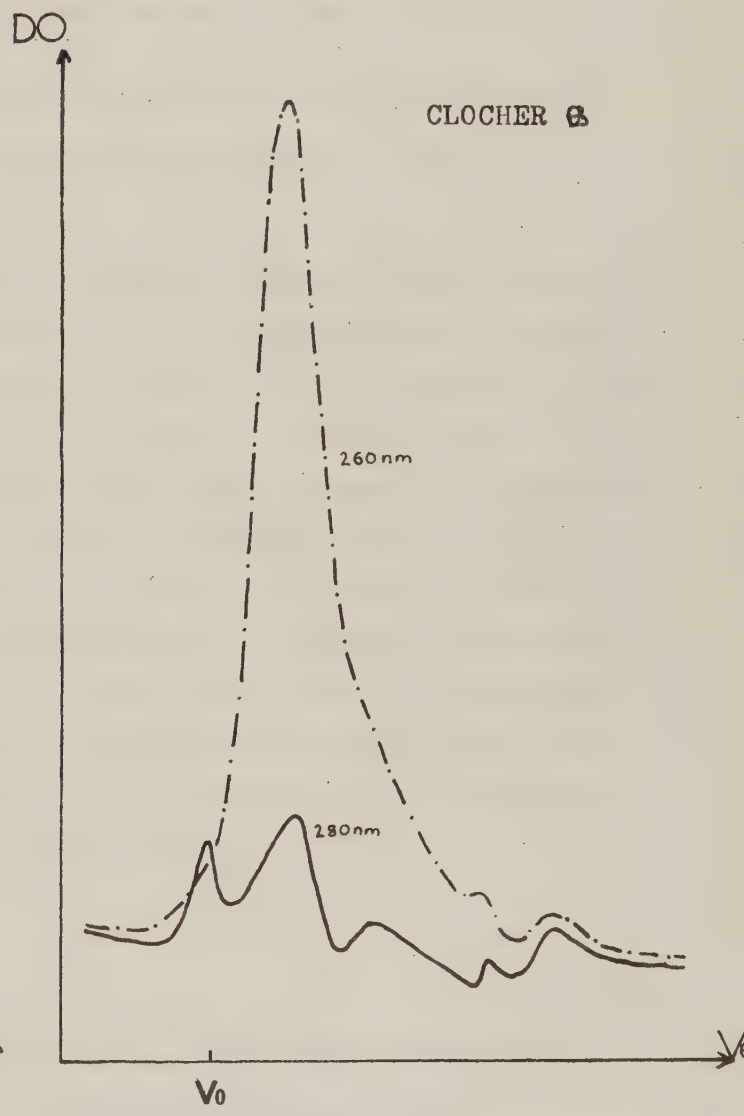
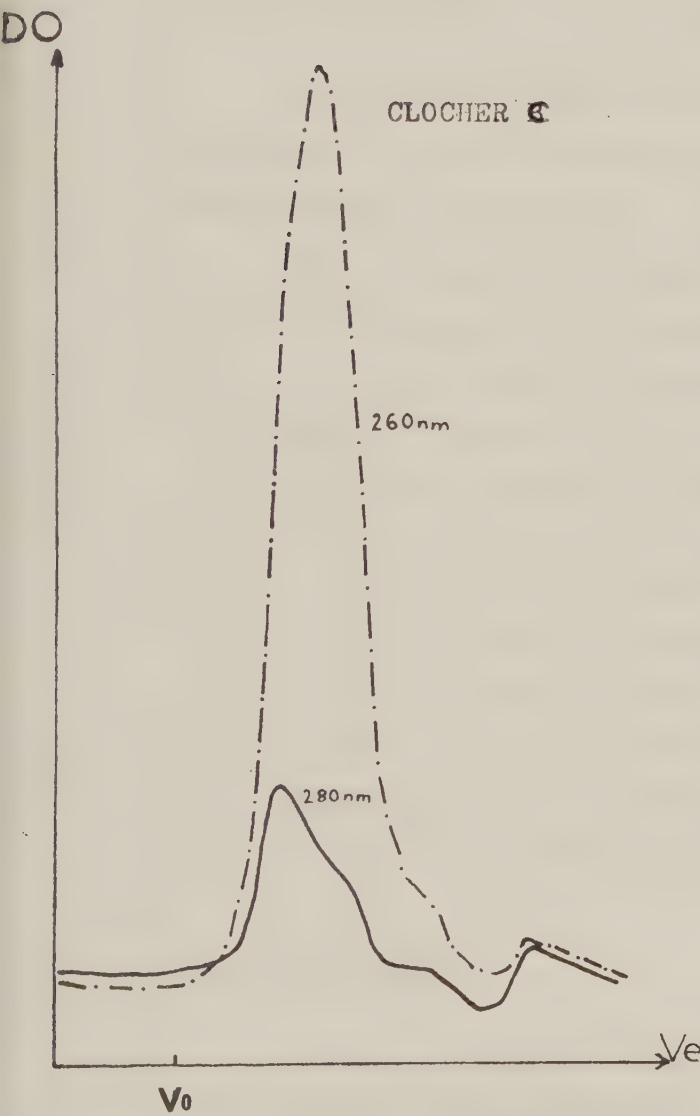
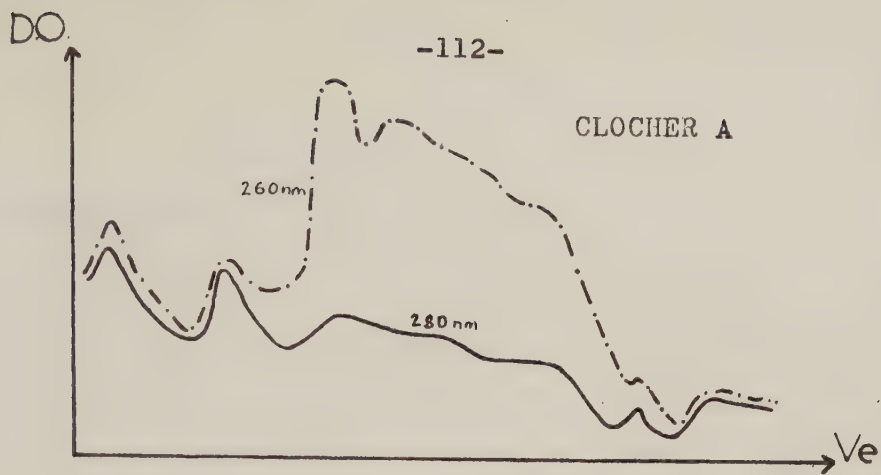


Fig.18 - CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX G 25

B/ RESULTATS

Un seul clocher est capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye : il correspond à une zone de focalisation de pH 4,0. L'activité est considérable puisque 1 unité équivaut à 2 ng de poudre lyophilisée. Un mg contient 500.000 unités (voir partie technique, Chapitre VII).

Par étude électrophorétique et immunoélectrophorétique ce facteur histaminopexique est identifié à une protéine de mobilité préalbuminique.

Contrairement à ce que nous avons observé après électrophorèse en gradient de densité, le noir amide révèle, en plus, une zone très diffuse légèrement en avant de la protéine étudiée. Nous devons chercher l'explication de ce phénomène dans la technique d'électrofocalisation elle-même. Après électrophorèse sur acétate de cellulose du mélange d'ampholines pH 3,0-5,0 utilisé, le noir amide révèle une zone qui s'étend du point de dépôt jusqu'en position préalbuminique. Il semble donc que le passage sur Sephadex G 25 de la fraction de pH 4,0 n'ait pas séparé parfaitement la partie protéique des ampholines. Une chromatographie sur Sephadex G 50 est certainement préférable pour éliminer totalement les Ampholines.

II- A/ TECHNIQUE

D'après ces premiers résultats, nous avons mené deux séparations isoélectriques successives dans l'appareil 8102. Un échantillon de 100mg peut ainsi être traité en une seule opération.

Deux prises d'essai d'origine différente sont étudiées : l'une est une fraction active obtenue par électrophorèse en gradient de densité; la deuxième correspond à l'échantillon actif obtenu par chromatographie de filtration sur Sephadex G 200.

Une différence de potentiel de 700 volts et une intensité de 8 milliampères sont appliquées pendant 72 heures.

Le tracé isoélectrophorétique est obtenu par enregistrement continu de la densité optique de l'éluat à 280 nm et à 240 nm et la courbe de pH par mesure de celui-ci sur chaque tube d'élution.

B/ RESULTATS

Ces tracés sont tout à fait comparables à celui établi lors de l'expérience précédente. Trois fractions sont étudiées.

Seule est active celle éluée dans la zone de pH 4,0. La même activité est retrouvée dans les fractions obtenues lors des trois essais, 1mg de poudre lyophilisée renferme 5×10^5 unités.

L'électrophorèse et l'immunoélectrophorèse ne font que confirmer la mobilité préalbuminique de la protéine.

C H A P I T R E V I I I

=====

CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION

SUR GEL DE SEPHADEX G 25 ET SUR BIOGEL P 10

Par les différentes techniques de fractionnement mises en oeuvre, nous disposons d'une préparation protéique très purifiée, riche en principe actif étudié. Nous avons pu apprécier cet enrichissement en déterminant à chaque stade de l'isolement la quantité minimale de préparation qui, au contact de l'iléon isolé de Cobaye (voir partie technique, chapitre VII), diminue au maximum l'activité biologique de l'histamine. Ce test pharmacologique ne nous permet pas de conclure à l'existence d'une combinaison biologiquement inactive entre l'histamine et la protéine isolée.

Il nous a donc paru nécessaire, à ce stade des travaux, de mieux préciser la nature du phénomène par une technique physico-chimique appropriée.

La chromatographie de filtration sur gel polymérisé hydrophile (voir partie technique, Chapitre IV) doit nous permettre de séparer le complexe histamine-protéine s'il existe, de l'histamine libre. Un mélange de dichlorhydrate d'histamine et de sérum humain ou d'une fraction protéique est séparé sur une colonne de gel de Séphadex G 25 ou de Biogel P 10 préalablement équilibré en liquide de TYRODE. L'histamine liée à la protéine est exclue du gel alors que l'histamine libre diffuse dans les mailles du gel et est retardée. L'éluat est recueilli dans un collecteur de fractions.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'histamine liée par rapport à l'histamine totale par détermination de la radioactivité de l'éluat. Sur une partie aliquote du contenu de chaque tube, nous mesurons la radioactivité β émise par le ^{14}C situé en position 2 du cycle imidazole de l'histamine (activité spécifique 54 mCi/mM).

I- CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SEPHADEX G 25

Deux expériences sont entreprises, l'une avec un sérum humain normal et l'autre sur un sérum de sujet allergique. Ces deux sérums sont choisis d'après le diagnostic clinique et les résultats du test pharmacologique.

A/ Technique

Un ml du sérum humain étudié et un ml d'une solution renfermant 50 nanogrammes de dichlorhydrate d'histamine radiomarkée sa-

laissés en contact 18 heures à 37°C. Après ce temps d'incubation, le mélange est séparé sur Sephadex G 25 dans une colonne présentant un volume total de 56ml et un volume mort de 30ml.

Les mesures de la radioactivité du pic exclu et de la radioactivité totale nous permettent d'exprimer les résultats par le rapport $\frac{\text{histamine liée}}{\text{histamine totale}} \times 100$. Nous déterminons également la radioactivité présente dans le Sephadex par suite de l'adsorption de l'histamine sur la matrice du gel.

B/ Résultats

Le sérum humain normal étudié capte 20 p.100 d'histamine mais nous constatons que 20 p.100 de dichlorhydrate d'histamine demeurent dans les grains du gel. 2 p.100 seulement d'histamine sont captés par le sérum de ce sujet allergique alors que 20 p.100 sont fixés sur le Séphadex.

C/ Conclusion

Ces deux sérums différenciés par la mesure pharmacologique et par le diagnostic clinique le sont nettement par cette technique de chromatographie. Le sérum humain normal capte dix fois plus d'histamine que le sérum de ce sujet allergique. Ces résultats rejoignent ceux de CERHOVA et CERNIK (19). Comme eux, nous constatons une fixation importante d'histamine dans les mailles du gel. Nous avons d'ailleurs montré que le Sephadex, comme un sérum humain normal, diminue l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. La disproportion entre la quantité d'histamine fixée sur le Sephadex et celle

liée à un sérum d'allergique ne nous semble pas favorable à une étude systématique. Dans les expériences suivantes, nous lui avons préféré le Biogel P 10.

II- CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR BIOGEL P 10

A/ Technique

Nous étudions l'influence de la durée d'incubation à 22°C et à 37°C, sur le pourcentage d'histamine liée par 2mg d'une fraction protéique dissoute dans 0,5ml de liquide de TYRODE.

La colonne de Biogel P 10 présente un volume total de 56 ml et un volume mort de 36 ml.

La quantité de dichlorhydrate d'histamine radiomarquée est de 50 ng.

A 22°C, le mélange histamine-protéine est fractionné sur Biogel P 10, sans incubation préalable et après 12 heures et 24 heures de contact.

A 37°C, le mélange histamine-protéine est incubé 15 minutes, 2 heures, 12 heures et 24 heures avant l'étude chromatographique.

B/ Résultats

Les résultats sont exprimés par le rapport :

$$\frac{\text{histamine liée}}{\text{histamine liée + libre}} \times 100$$

sont reportés dans le tableau VIII et la figure 19.

TABLEAU VIII

Influence du temps et de la température
sur le pourcentage d'histamine fixée

	<u>22°C</u>	<u>37°C</u>
<u>Temps d'incubation</u>		
sans incubation	0	
15 minutes		11
2 heures		21
12 heures	26	33
24 heures	21	20

L'élévation de la température, même pour un temps d'incubation très court de 15 minutes, favorise la liaison entre l'histamine et la protéine étudiée.

Si nous comparons les résultats obtenus en fonction du temps à 22°C et à 37°C, la durée optimale d'incubation se situe aux environs de 12 heures (Figure 20).

De plus pour des temps d'incubation suffisamment longs, l'action de la température devient négligeable.

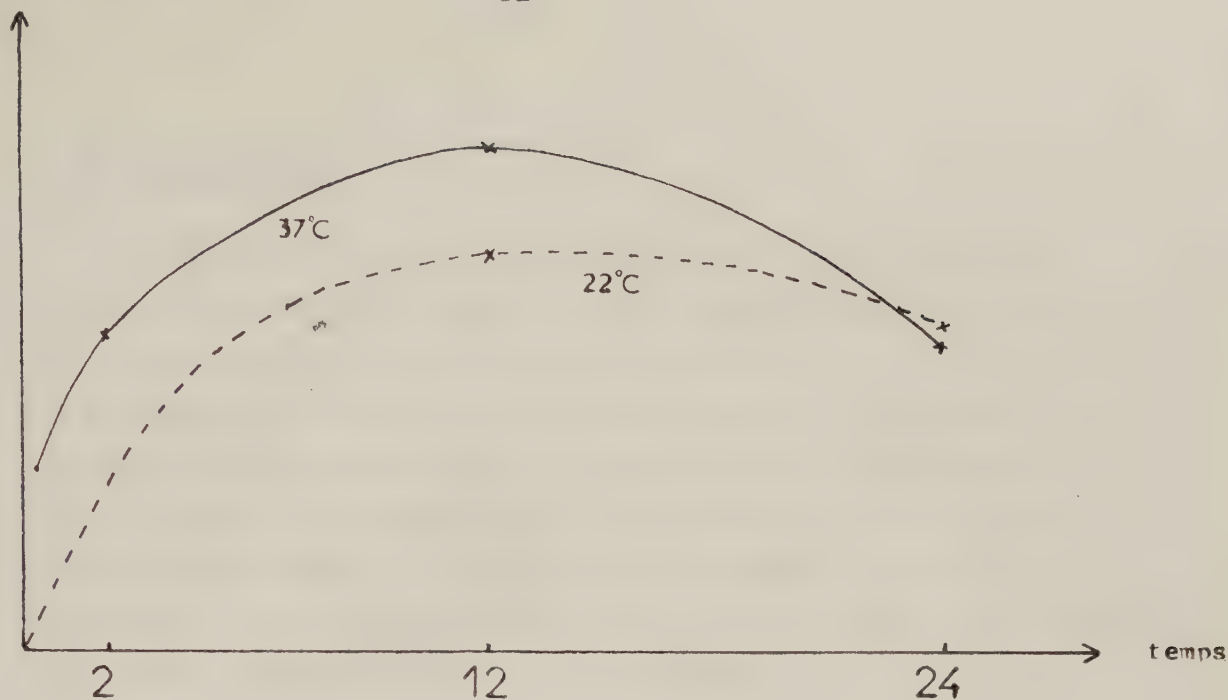


Fig. 19 - Influence du temps et de la température sur le pourcentage d'histamine fixée

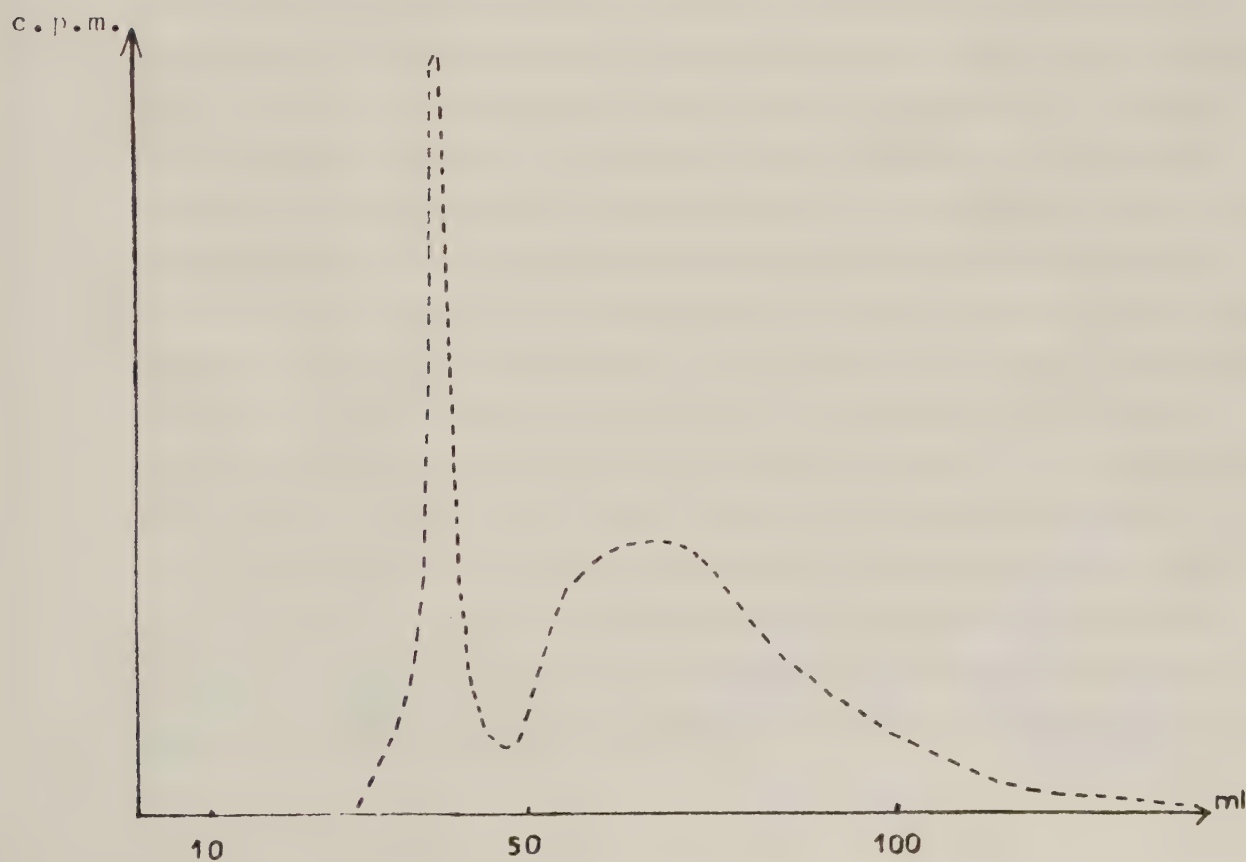


Fig. 20 - CHROMATOGRAPHIE SUR BIOGEL P 10 du mélange Histamine-Protéine après incubation de 12 heures à 37°C.

C/ Conclusion

En fonction de ces données, nous avons entrepris l'étude de quelques sérums de sujets allergiques et normaux. Une seule condition opératoire est modifiée. Il nous semble préférable d'effectuer la chromatographie d'un mélange dont les deux constituants ont été équilibrés indépendamment à 37°C de façon à se rapprocher des conditions physiologiques. Les quelques essais réalisés ne nous permettent pas de différencier aussi nettement que lors des premiers cas étudiés, les sérums normaux de ceux allergiques.

De nombreux chercheurs ont tenté avec plus ou moins de succès de reproduire, par des techniques différentes, les résultats de l'équipe de PARROT. BEALL (9) par chromatographie sur gel de Séphadex G 25 nie l'existence d'une telle combinaison. Son échec est peut-être dû au fait que l'histamine liée à la protéine ne peut pas se combiner à l'orthophthaldéhyde. D'autres auteurs, comme CERHOVA et CERNIK (19) par chromatographie sur gel de Sephadex G 25, GUIRGUIS (41) et PORTER et SMITH (82) par la méthode pharmacologique, différencient bien les deux types de sérums mais de façon moins absolue que PARROT et ses collaborateurs. Les sérums de sujets allergiques peuvent ne pas capter l'histamine ou présenter un pouvoir histaminopexique très variable quoique faible. Ils constatent d'un jour à l'autre une très grande variation du pouvoir histaminopexique du sérum d'un même sujet allergique. Nous avons espéré pouvoir en quelques expériences établir un protocole opératoire non seulement pour définir le terrain allergique mais pour suivre l'enrichissement de chaque préparation en

principe actif au cours d'un nouvel isolement. Plusieurs difficultés sont survenues. L'histamine, composé basique hétérocyclique, a tendance à demeurer dans les mailles du gel par liaison électrostatique avec les quelques groupements carboxyliques présents et par adsorption surtout sensible aux très faibles concentrations en histamine. Le premier type de liaison peut être évité en ayant recours à un liquide d'élution riche en sels ; nous avons opéré en liquide de TYRODE. Il est beaucoup plus difficile de s'opposer aux phénomènes d'adsorption ; il est sans doute souhaitable d'utiliser un liquide d'élution contenant l'histamine à une certaine concentration qu'il nous faut déterminer.

Les résultats obtenus par la détermination de la radioactivité du ^{14}C ne sont pas exprimés en valeur absolue, car nous n'avons pas tenu compte du rendement ni des phénomènes d'autoabsorption.

Néanmoins de ces premiers résultats nous pouvons affirmer qu'il existe dans les sérums étudiés une protéine qui capte l'histamine.

L'existence d'une telle liaison pouvait être soupçonnée lors des premiers relargages par le sulfate d'ammonium.

Nous avons comparé les activités d'une fraction active de relargage avant et après incubation avec l'histamine et attribué la diminution de l'activité observée après incubation, à une combinaison de l'histamine avec la protéine étudiée (voir partie expérimentale Sérum humain, chapitre X).

Dans un but identique, nous avons étudié l'activité pharmacologique du complexe histamine radiomarquée - protéine, exclu lors d'une chromatographie sur Biogel P 10. Dialysée, concentrée

et lyophilisée, la préparation est soumise au test pharmacologique. Nous constatons là encore une diminution sensible de l'activité comme si la protéine préalablement liée à l'histamine radioactive ne pouvait fixer qu'une quantité moindre de l'histamine introduite dans le bain d'expérience. Il semble exister une corrélation entre les techniques pharmacologique et physico-chimique. Il n'est cependant pas exclu que la diminution de l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye observée avec nos préparations protéiques traduise deux phénomènes : l'un physicochimique, l'autre pharmacologique. Néanmoins, par ces dernières expériences, nous pouvons envisager l'existence dans le sérum d'une protéine capable "in vitro" de fixer l'histamine.

C H A P I T R E I X

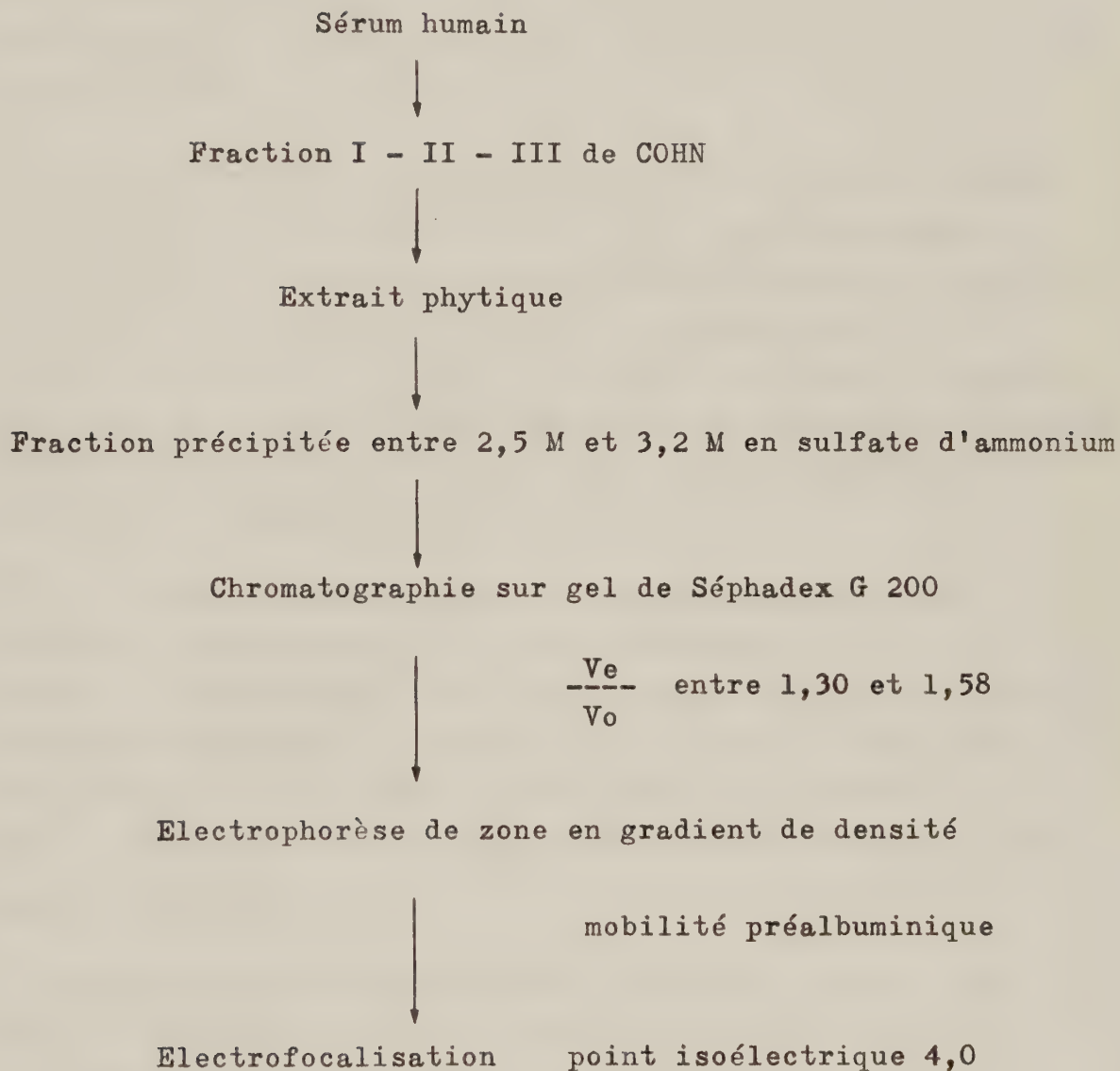
=====

DISCUSSION DES RESULTATS

L'isolement du principe actif étudié est obtenu suivant deux plans de fractionnement fort peu différents. Le mélange de sérums humains normaux n'est traité ni par l'éthanol, ni par l'acide phytique. Ces deux techniques de précipitation, qui interviennent dans le deuxième plan établi (tableau IX) ont un intérêt indéniable dans la mesure où elles conduisent, par l'élimination des protéines majeures du sérum, à une faible quantité de préparation (voir partie expérimentale, Sérum humain, Chapitre IV). Un kilogramme d'une masse hydratée correspondant aux fractions I - II - III de COHN traité par le sulfate d'ammonium et par l'acide phytique donne 1 gramme de produit que l'on peut fractionner aisément par chromatographie de filtration sur gel polymérisé hydrophile. Dans les deux cas, l'enrichissement est identique, puisque, après électrofocalisation, nous obtenons deux préparations protéiques renfermant chacune 500.000 unités par mg.

TABLEAU IX

PLAN DE FRACTIONNEMENT



A ce stade nous pouvons regrouper en une fiche signalétique, les caractéristiques physicochimiques d'une entité chimique maintenant bien définie.

- C'est une glycoprotéine phytosoluble. Nous savions déjà par les travaux de LABAT et coll. (50) que l'action de la neuraminidase en libérant l'acide sialique lui fait perdre son pouvoir de fixer l'histamine.

- La zone optimale de précipitation par le sulfate d'ammonium se situe entre 2,5 M et 2,8 M à pH 7,0. Cette zone est certainement plus étroite, une détermination précise ne peut être réalisée que sur une solution de principe actif très purifié. La protéine captant l'histamine n'est pas une immunoglobuline qui précipite à des concentrations molaires en sulfate d'ammonium beaucoup plus faibles (voir partie expérimentale, Sérum humain, Chapitre III).

- Le poids moléculaire est, en première approximation, légèrement supérieur à celui d'une immunoglobuline G. Dans la mesure où, sur Sephadex G 200, les glycoprotéines sont parfois éluées plus rapidement que ne le laisse prévoir leur poids moléculaire, il faut rester prudent sur cette détermination établie d'après le rapport $-\frac{V_e}{V_o}$ (partie expérimentale, Sérum humain, Chapitre V - VI).

- Sa mobilité électrophorétique, identique sur tous les supports utilisés (agarose, acétate de cellulose, gradient de saccharose) la situe comme une préalbumine.

- L'électrofocalisation permet enfin de donner une valeur de son point isoélectrique très voisin de 4,0.

A l'issue de l'électrofocalisation qui est la méthode de fractionnement des protéines la plus fine dont nous disposons actuellement, il nous semble possible d'estimer la concentration d'un sérum humain normal en protéine active; d'après l'étude comparative des dilutions limites des solutions de la protéine isolée et de sérums humains normaux, nous pouvons situer la concentration d'un sérum humain normal entre 5 et 10mg par litre.

PARTIE EXPERIMENTALE

SERUM DE PORC

I N T R O D U C T I O N

=====

Il était intéressant de rechercher s'il n'existait pas dans le sérum d'une espèce animale, un facteur analogue à celui du sérum humain capable de dissimuler partiellement l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. En 1956, GRANDADAM (38) avait déjà étudié le pouvoir de captation de l'histamine des sérums de Boeuf, Cheval et Chien et conclu à l'existence d'un facteur histaminopexique sérique chez ces espèces. Nous avons porté notre choix sur le sérum de Porc bien que les premiers résultats obtenus (18) aient été négatifs.

La collecte de volumes importants de sérum dès l'abattage des animaux, ne pose aucun problème. De plus, la similitude des diagrammes électrophorétiques des sérums de porcs et des sérums humains obtenus après électrophorèse de frontière (MOORE, 57) orienta définitivement notre choix.

Parallèlement à la mise en évidence et à l'isolement du facteur histaminopexique sérique, nous avons entrepris une étude de certaines caractéristiques physicochimiques des protéines du sérum de Porc.

C H A P I T R E X

=====

ETUDE DES PROTEINES DU SERUM DE PORC

I- COMPORTEMENT ELECTROPHORETIQUE

Nous avons établi le protéinogramme et le glycoprotéinogramme de cinq sérums de porcs sur différents supports : papier (Figure 21), acétate de cellulose et agarose.

Pour l'électrophorèse à pH 8,6 sur acétate de cellulose, quatre fractions sont séparées : albumine, α , β et γ globulines. Si ce tracé est comparé à celui d'un sérum humain, nous constatons l'absence de α_1 globulines et la présence d'une importante fraction de mobilité α_2 globulinique (Figure 22).

Une détermination quantitative de ces quatre fractions précise mieux cette différence de répartition des mobilités électrophorétiques. Le rapport albumines/globulines est plus faible pour le sérum de Porc.

Il se situe aux environs de 0,80; ceci est dû à un taux plus faible de la sérumalbumine porcine et surtout à un pourcentage beaucoup plus élevé des α_2 globulines du sérum de Porc.

Noir amide

Acide periodique
Réactif de SCHIFF

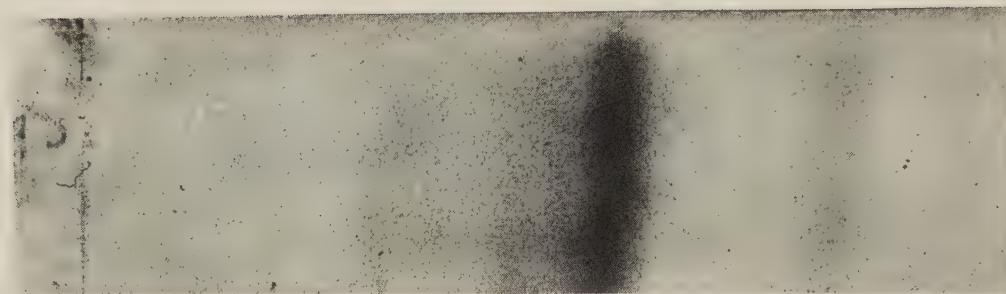


Fig. 21 - ELECTROPHORESE SUR PAPIER à pH 8,6

Sérum humain

Sérum porcin

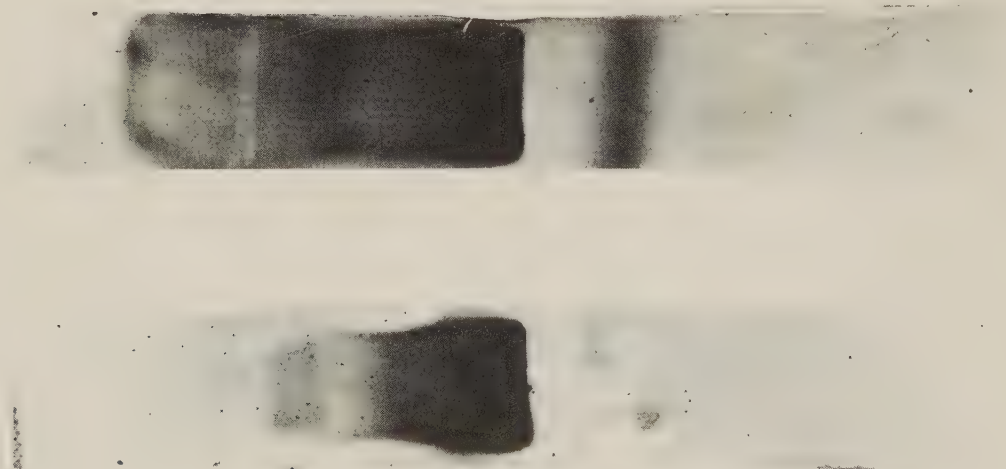


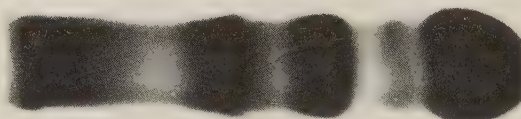
Fig. 22 - ELECTROPHORESE SUR acétate de cellulose à pH 3,9

PROTEINOGRAMME

Sérum de porc



Sérum humain



GLYCOPROTEINOGRAMME

Sérum de porc



Sérum humain

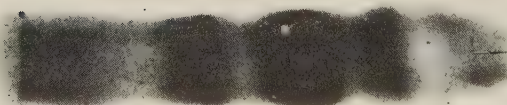


Fig.23 - ELECTROPHORESE SUR ACETATE DE CELLULOSE à pH 8,6

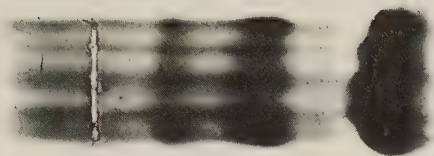
Après électrophorèse sur acétate de cellulose en tampon pyridine-acide acétique de pH 3,9 et révélation des glycoprotéines par le réactif de Schiff après oxydation periodique, nous ne mettons en évidence aucune fraction glycoprotéique de mobilité anodique. L'homologue de l' α_1 glycoprotéine acido-soluble, s'il existe, ne présente pas les mêmes caractéristiques électrophorétiques (Figure 21).

A pH 8,6 l'électrophorèse en gel d'agarose d'un sérum de Porc donne des résultats comparables à ceux obtenus sur acétate de cellulose. L'immunoélectrophorèse révélée par un immunosérum de Lapin antisérum de Porc préparé dans notre laboratoire confirme l'hétérogénéité de la zone de mobilité α_2 globulinique (Figure 24).

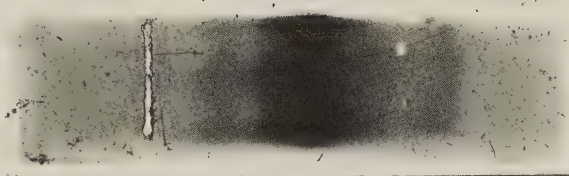
SCOPES (89) étudiant le comportement électrophorétique des sérums de porcs en gel d'amidon, observe une résolution des protéines bien supérieure à celle obtenue avec tous les autres supports. Il identifie ainsi 20 à 25 constituants et constate un polymorphisme des protéines sériques de porcs de races différentes dans la zone des préalbumines et des α et β globulines.

II- PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM ET PAR L'ACIDE PHYTIQUE

Il nous a paru rationnel d'appliquer les mêmes techniques de fractionnement des protéines du sérum humain à celles du sérum de Porc.



Noir amide



Acide periodique
Réactif de SCHIFF



Antisérum de porc

Fig. 24 - ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE à pH 8,2

Dans les conditions optimales de relargage par le sulfate d'ammonium, la sérumalbumine de Porc se retrouve dans la fraction soluble à une concentration 2M de ce sel alors que les immunoglobulines sont précipitées.

Des études comparatives entre les zones de relargage des globulines du sérum de Porc et celles du sérum humain ont déjà été réalisées. L' α_2 macroglobuline de Porc précipite entre 1,4 M et 2 M de concentration en sulfate d'ammonium alors que l'homologue humain présente une zone de relargage plus étroite entre 1,52 M et 1,92 M en sulfate d'ammonium (DEMAILLE et coll., 29).

L'acide inositohexaphosphorique, à pH 2,10 se combine à la plupart des protéines sériques du Porc. Certaines sont phytosolubles. L'étude du glycoprotéinogramme d'un extrait phytique montre la présence d'une fraction α_2 glycoprotéique très importante et confirme l'absence d'un homologue de l'orosomucoïde humain, constituant majeur d'un extrait phytique de sérum humain (AGNERAY, 1). Une étude qualitative et quantitative de l'extrait phytique obtenu est entreprise. Le dosage des hexoses combinés par la technique à l'orcinol (AGNERAY et coll., 3) permet la détermination du taux de glycoprotéines. Alors qu'un millilitre de sérum humain normal renferme en moyenne 2mg de glycoprotéines phytosolubles exprimées en hexose, les sérums porcins étudiés ici en sont beaucoup plus riches puisque tous les résultats obtenus sont supérieurs et nettement à 2mg/ml.

III- CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX G 200

Les constituants protéiques du sérum de Porc sont séparés par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200 en fonction de leur poids moléculaire. 100 ml de sérum de Porc sont ainsi étudiés sur une colonne de 2 mètres de hauteur et de 5 cm de diamètre, équilibrée en tampon Tris 0,1 M-NaCl 1M pH 8 (Voir partie technique, Chapitre IV). La mesure de la densité optique de l'éluat à 280 nm révèle trois pics.

Leurs rapports V_e/V_o sont tout à fait comparables à ceux des fractions séparées lors de la chromatographie d'un sérum humain.

Leur étude électrophorétique et immunoélectrophorétique permet de mieux préciser la nature de leurs constituants. Les composés majeurs du sérum humain trouvent leur homologue dans la même zone d'élution, avec les mêmes caractères de mobilité électrophorétique et un rôle physiologique identique, dans la mesure où ceux-ci sont connus (Figure 25).

Parmi les protéines de constante de sédimentation 19 S, nous identifions une α_2 macroglobuline et une immunoglobuline M qui présente une similitude antigénique avec celle du sérum humain.

Dans le deuxième clocher à côté des immunoglobulines G, nous avons plus particulièrement étudié une α_2 glycoprotéine, transporteur du cuivre. Sa mobilité électrophorétique et sa position immunoélectrophorétique, identiques à celles de son

homologue du sérum humain ont été déterminées précisément grâce à ses propriétés oxydasiques (SCHEN et RABINOVITZ,85). Cette propriété particulière nous a également permis de localiser la céruléoplasmine au cours des divers fractionnements. Divers auteurs (VAN DEN HAMER,et coll.,95)ont constaté une certaine similitude antigénique avec la céruléoplasmine humaine.

L'étude des protéines de constante de sédimentation 5 S permet d'identifier l'albumine, plusieurs α_2 globulines, deux α_1 globulines dont la transferrine.

Le passage de ce troisième clocher sur une colonne de D.E.A.E. Sephadex A 50 équilibré dans un tampon Tris 0,05M de pH 8,0 conduit à l'obtention de la transferrine de Porc dans un grand état de pureté.Cette technique est adaptée de celle établie lors de la préparation de la transferrine humaine (GELOTTE et coll.,36).

C H A P I T R E X I

=====

ISOLEMENT A PARTIR DU SERUM DE PORC D'UN FACTEUR CAPABLE DE

=====

DIMINUER L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON

=====

ISOLE DE COBAYE

=====

I- RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

A/ Technique

Un litre de sérum de Porc dilué au demi par une solution de chlorure de sodium à 0,8 p.1000 est traité par le sulfate d'ammonium. Nous obtenons quatre fractions :

- précipitant à une concentration 1,5 M en sulfate d'ammonium à pH 7,0
- précipitée entre 1,5 M et 2,2 M à pH 7,0
- précipitée entre 2,2 M et 3,6 M à pH 7,0
- précipitée par acidification du milieu à pH 3,5 sans modifier la concentration en sulfate d'ammonium (voir partie technique, Chapitre III).

Après dialyse, concentration et lyophilisation des fractions, nous étudions leur pouvoir de capter l'histamine et effectuons des électrophorèses sur agarose.

B/ Résultats

L'activité se localise dans la première fraction et dans la zone de relargage 2,2 M à 3,6 M. La mise en évidence d'une activité dans deux échantillons non contigus est inhabituelle et mérite une étude complémentaire. Par électrophorèse sur agarose du premier précipité obtenu, nous identifions les immunoglobulines, plusieurs α_2 globulines et des traces d'albumine. La présence de celle-ci est anormale puisqu'elle précipite à une concentration en sulfate d'ammonium supérieure à 2 M. Nous avons donc envisagé la possibilité d'une adsorption de l'albumine et éventuellement d'autres protéines sur le précipité d'immunoglobulines par suite d'une dilution insuffisante de la prise d'essai initiale.

II- DOUBLE PRECIPITATION PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

A/ Technique

Il nous fallait prouver l'existence d'une coprécipitation éventuelle. Nous avons donc redissous le premier précipité dans un litre de solution de chlorure de sodium à 0,8 p.1000 et réalisé un nouveau relargage des protéines à la même concentration 1,5 M en sulfate d'ammonium.

B/ Résultats

Seule la fraction soluble à une concentration 1,5 M en sulfate d'ammonium est capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye.

Ce facteur protéique a donc tendance à s'adsorber sur les immunoglobulines qui précipitent massivement dès l'addition de sulfate d'ammonium. Il est relargué à une concentration plus élevée, entre 2,2 M et 3,6 M.

Cette dissociation des résultats pharmacologiques avant et après précipitation n'est pas sans intérêt; elle montre bien que, malgré une dilution au demi du sérum initial, ce facteur protéique coprécipite aisément avec les immunoglobulines et explique le fait que ce composé ait été longtemps assimilé à une immunoglobuline G obtenue par des techniques de précipitation (fractionnement de COHN, technique de DEUTSCH).

III- CHROMATOGRAPHIE DE FILTRATION SUR SEPHADEX G 200 D'UN EXTRAIT PHYTIQUE DE SERUM DE PORC

A/ Technique

Un mélange de sérums porcins est traité par l'acide phytique à pH 2,10 (voir partie technique, Chapitre II). La plupart des protéines précipitent. Seule la partie phytosoluble retient notre attention. Après centrifugation du précipité, le surnageant est dialysé contre l'eau distillée, concentré et lyophilisé. L'extrait phytique obtenu est soumis au test phar-

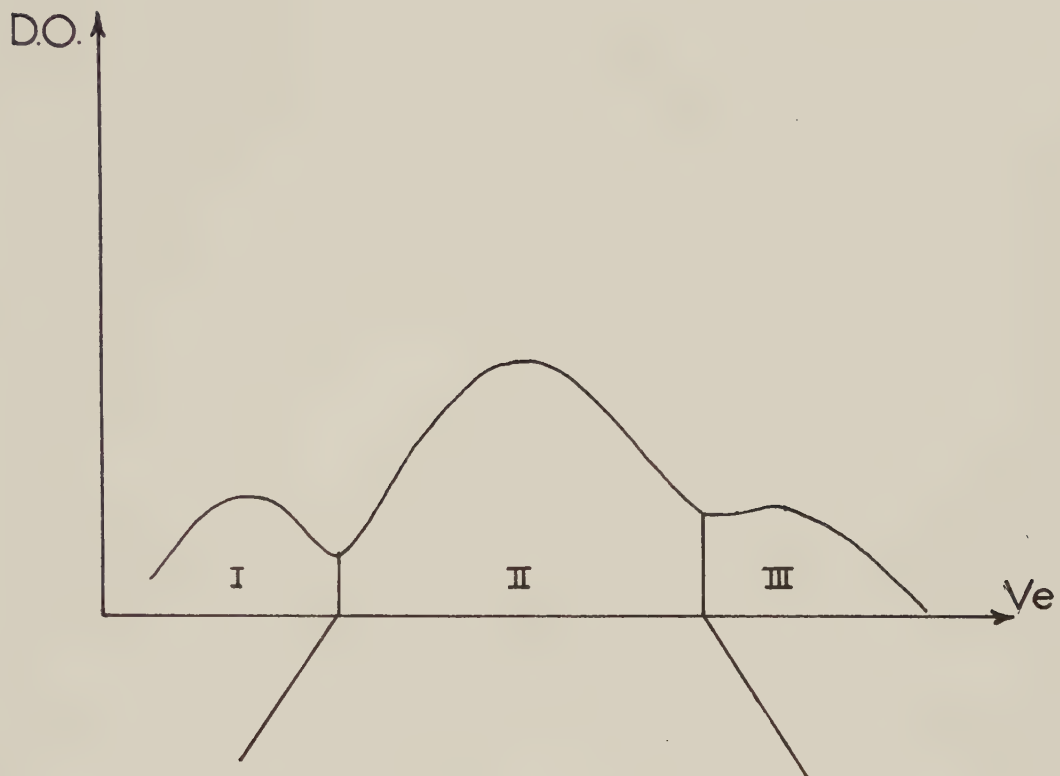
macologique; actif, il inhibe partiellement l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Ses constituants sont alors fractionnés en fonction de leur poids moléculaire par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200 équilibré dans un tampon Tris 0,1 M NaCl 1 M de pH 8,0. L'enregistrement de la densité optique de l'éluat à 280 nm montre trois clochers, le deuxième étant le plus important (Figure 26). Les tubes de chaque clocher sont regroupés et les fractions obtenues sont dialysées, concentrées et lyophilisées.

B/ Résultats

Seul le deuxième pic est capable de diminuer l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Le rapport V_e/V_o du principe actif se situe donc entre 1,40 et 1,70, mais cette fraction, comme le montre l'étude électrophorétique sur agarose à pH 8,6, est encore très hétérogène. Le noir amide révèle une bande de mobilité albuminique, une zone importante de mobilité α_2 globulinique et des traces d'immunoglobulines. Par la technique des dilutions limites, nous constatons que 0,3 μ g de poudre équivaut à une unité (voir partie technique, Chapitre VII). La faible concentration en principe actif de ce deuxième clocher pouvait être soupçonnée dès l'étude électrophorétique.

Néanmoins, nous pouvons proposer un ordre de grandeur de son poids moléculaire, voisin de celui d'une immunoglobuline G.

Quel que soit l'enrichissement obtenu, il ne faut pas négliger l'intérêt de cette technique de chromatographie de filtration, puisqu'elle permet de séparer de la fraction active,



cide periodique
éactif de SCHIFF

Fig.26 - CHROMATOGRAPHIE sur gel de SEPHADEX G 200 d'un
EXTRAIT PHYTIQUE DE SERUM DE PORC.

les composés de constante de sédimentation 19 S et 5 S. La zone active n'en est pas moins hétérogène; ceci est dû en partie à la présence de nombreux composés de mobilité α_2 globulinique. Lors de l'étude préliminaire des sérums porcins, nous avons déjà observé leur forte teneur en α_2 globulines. Il faut donc admettre à la suite de ce travail que certaines d'entre elles sont phytosolubles et présentent une constante de sédimentation 7 S.

Il était indispensable de recourir à un autre mode de fractionnement dans le but d'obtenir le facteur capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye dans un grand état de pureté.

IV-SEPARATION PAR ELECTROPHORESE DE ZONE EN GRADIENT DE DENSITE

A/ Technique

Les composés protéiques de l'échantillon actif obtenu précédemment sont séparés d'après leur mobilité électrophorétique.

L'électrophorèse de zone est réalisée en veine liquide dans l'appareil LKB 3340 C (Figure 2). Les protéines sont stabilisées dans leur zone de migration par un gradient de densité (voir partie technique, chapitre V).

La prise d'essai est de 150mg dissous dans 3ml de tampon. Une différence de potentiel de 530 volts et une intensité de 22 milliampères sont appliquées pendant 12 heures.

L'enregistrement de la densité optique de l'éluat à 280 nm montre trois clochers. Si nous comparons ce tracé à celui d'un sérum humain obtenu dans les mêmes conditions, nous pouvons attribuer au pic I une mobilité préalbuminique, au pic II, une mobilité α_2 globulinique et au pic III une mobilité β globulinique (Figure 27). Le clocher II représente la fraction majeure. Trois fractions sont retenues pour l'étude pharmacologique. Elles sont dialysées contre l'eau distillée fréquemment renouvelée pour éliminer les sels et le saccharose puis concentrées et lyophilisées.

B/ Résultats

La fraction I est seule capable de capter l'histamine "in vitro". Le noir amide, après électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,6, révèle une protéine de mobilité préalbuminique. Les α_2 glycoprotéines qui étaient les constituants majeurs de la préparation active obtenue par chromatographie de filtration sont, par électrophorèse, séparés du facteur étudié. Leur élimination conduit à un échantillon plus actif.

V- ELECTROFOCALISATION

La grande mobilité de la fraction active en veine liquide ou sur support gélifié laisse prévoir un point isoélectrique situé entre pH 3,0 et 5,0.

Nous avons décidé de mener la séparation isoélectrique dans un mélange d'Ampholine capable de créer un gradient de pH entre ces deux valeurs.

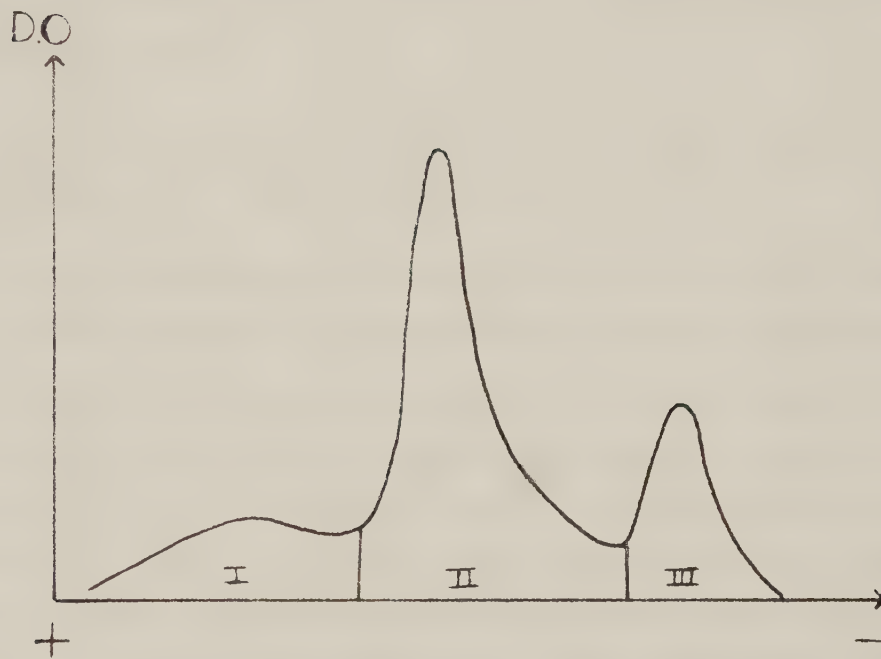


Fig. 27 - ELECTROPHORESE DE ZONE EN GRADIENT DE DENSITE
de la fraction active obtenue par chromatographie
sur gel de SEPHADEX G 200.

A/ Technique

La séparation est réalisée à l'échelle analytique dans l'appareil LKB 8101. 20mg de la préparation précédente sont dissous dans 3ml d'eau distillée; la solution est dialysée pendant 24 heures.

Le gradient de densité est établi par paliers successifs (voir partie technique, Chapitre VI).

Une différence de potentiel de 300 volts et une intensité de 1 milliampère sont maintenues pendant 72 heures.

La densité optique de l'éluat dont le débit est régulé par une pompe, est enregistré à 280 nm. Le pH est déterminé sur le contenu de chaque tube. La figure 28 illustre le résultat de cette séparation. Nous observons deux clochers extrêmes I et IV très importants correspondant aux produits oxydés ou réduits au contact des électrodes respectives et deux clochers intermédiaires de faible amplitude. Les tubes sont regroupés en fonction du tracé optique et du pH en quatre fractions. Après dialyse, concentration et lyophilisation, elles sont soumises au test pharmacologique.

B/ Résultats

La fraction II est seule capable de diminuer l'action contracturante de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye. Son activité est considérable puisque, par l'étude des dilutions successives, nous constatons que deux nanogrammes de poudre lyophilisée correspondent à une unité (voir partie technique, Chapitre VII).

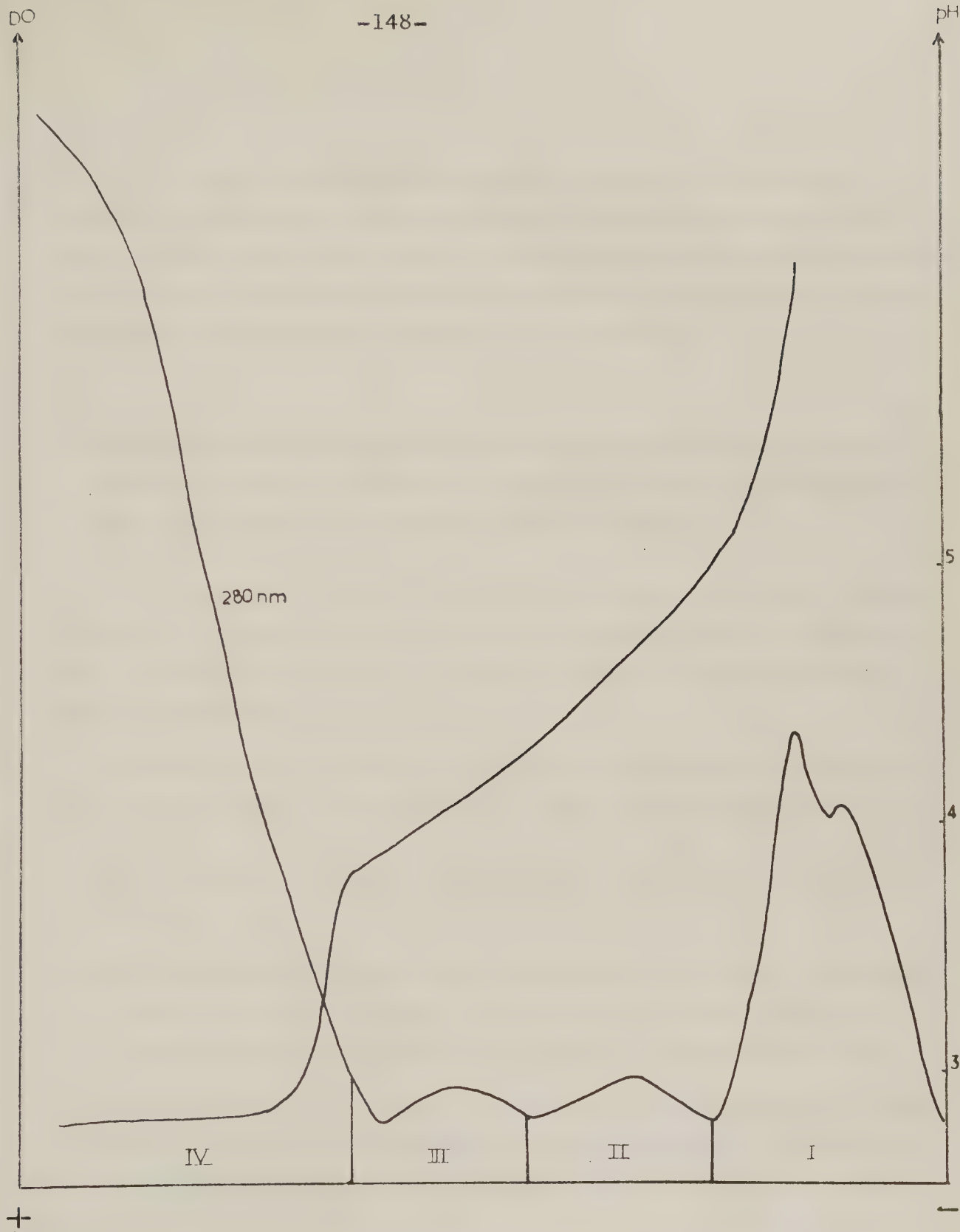


Fig.28 - ELECTROFOCALISATION de la fraction active obtenue par électrophorèse en gradient de densité (sérum de porc)

L'étude électrophorétique sur acétate de cellulose à pH 8,6 atteste de l'homogénéité de la préparation. Le noir amide révèle une seule bande de mobilité préalbuminique. D'après sa zone de focalisation, nous pouvons lui attribuer une valeur de point isoélectrique entre pH 3,90 et 4,10.

VI-ETUDE DES CARACTERES PHYSICOCHEMQUES DU FACTEUR ISOLE DU
SERUM DE PORC ET CAPABLE DE DIMINUER L'ACTIVITE BIOLOGIQUE
DE L'HISTAMINE SUR L'ILEON ISOLE DE COBAYE

Ce travail réalisé à partir du sérum porcin nous permet d'établir un plan de purification du principe actif recherché mais surtout d'en décrire à chaque stade les caractéristiques physicochimiques.

Ce facteur capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de Cobaye est une glycoprotéine.

- Constituant de l'extrait phytique, elle présente un caractère acide.
- Elle précipite pour des concentrations en sulfate d'ammonium comprises entre 2,2 M et 3,6 M à pH 7,0. Cette zone de relargage est différente de celles des immunoglobulines.
- Par chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200, nous pouvons lui attribuer un poids moléculaire de l'ordre de celui des immunoglobulines G.
- De mobilité préalbuminique, quel que soit le support utilisé en électrophorèse, son point isoélectrique déterminé par électrofocalisation est proche de 4,0.

Si nous comparons ces propriétés à celles décrites pour la protéine isolée d'un sérum humain normal, nous sommes frappés par leur parallélisme étroit (voir partie expérimentale : sérum humain, Chapitre IX). Cette similitude ne s'arrête pas là. En effet, les deux préparations présentent la même activité sur le test pharmacologique : 500.000 unités par milligramme de poudre lyophilisée. La présence d'un nombre identique d'unités par milligramme de poudre tend à prouver que nous avons atteint dans les deux cas un haut degré de purification.

Néanmoins, malgré un grand nombre de propriétés communes, nous ne pouvons pas admettre à ce stade d'étude leur parfaite identité. Il nous faut donc aborder d'autres méthodes d'étude comparative et rechercher avant tout s'il existe une communauté antigénique entre ces deux protéines sériques d'espèces différentes. Nous avons utilisé la technique d'OUCHTERLONY (61) en disposant alternativement de part et d'autres d'une rigole contenant un immunsérum anti sérum humain (RC005 de BOEHRINGER), des solutions de concentrations décroissantes de protéines d'origines humaine et porcine. Après une diffusion de quarante huit heures, aucun arc n'est visible autour des dépôts des solutions de protéines de sérum de Porc.

Un immunsérum anti sérum humain ne révèle pas la protéine sérique de Porc. Il n'existe donc pas à priori de communauté antigénique entre les deux protéines. Pour confirmer ceci, il faudrait multiplier les essais d'immunodiffusion en faisant varier les concentrations relatives de chaque solution de protéine. En fait, la certitude absolue de l'identité des deux protéines ne peut nous être donnée que par la préparation d'immunsérum spécifique que nous n'avons pas encore à notre disposition.

C H A P I T R E X I I

=====

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons isolé des sérums humain et porcin, une protéine capable de fixer in vitro l'histamine. Des précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium et par l'acide phytique ont permis d'obtenir un produit d'activité accrue. La purification est poursuivie par chromatographie sur gel de Sephadex G 200, par électrophorèse en gradient de saccharose et par électrofocalisation. A tous ces stades, l'identification de la préparation active repose sur la technique pharmacologique sur l'iléon isolé de Cobaye et l'enrichissement est apprécié par la détermination de l'activité limite. Les résultats sont exprimés en unités d'activité par mg de fraction (voir partie technique, chapitre VII). Cet ensemble de méthodes nous a permis d'obtenir une glycoprotéine de poids moléculaire voisin de celui d'une immunoglobuline G, de mobilité préalbuminique et de point isoélectrique voisin de 4,0. Cette substance a un pouvoir de captation de l'histamine environ dix mille fois supérieur à celui d'un même poids du mélange des protéines du sérum.

Nous avons ensuite étudié le pouvoir de captation de fractions protéiques enrichies par une technique physicochimique appropriée. Par chromatographie sur Biogel P 10, nous apportons la preuve de l'existence d'une liaison entre la protéine et l'histamine marquée au ^{14}C .

Cette combinaison n'est peut-être pas spécifique de l'histamine. Il peut s'agir d'un phénomène plus général que l'on pourrait appeler aminopexie (32). Ceci est à rapprocher des travaux de OH et coll. (60) sur la combinaison de plusieurs amines comme la mescaline, la tyramine et la 3-4 dihydroxyphényl-éthylamine avec les protéines sériques. Il est indispensable de pouvoir établir les constantes d'association de la protéine avec l'histamine et d'autres amines.

Cette étude est maintenant possible puisque nous disposons, à la fin de ce travail, d'une protéine très purifiée.

B I B L I O G R A P H I E

=====

- 1- AGNERAY J.
Fractionnement des protéines du sérum sanguin à l'aide de
l'acide inosito hexaphosphorique
Thèse Doct.Sci., Lille 1965 (Première thèse)
- 2- AGNERAY J.
Théorie de la Filtration sur gel
Thèse Doct.Sci., Lille 1965 (Deuxième thèse)
- 3- AGNERAY J., COHEN-SOLAL J., FEGER J. et ROUSTAN R.
G.M.de France, 1968,75,1803
- 4- AGNERAY J., COURTOIS J-E., DURAND G., FEGER J., LEBEL B. et
PARROT J-L.
C.R.Acad.Sci, 1968,267,260
- 5- ANDREWS P.
Biochem.J., 1964,91,222
- 6- ANREP G.V., BARSCUM G.S., SALAMA S. et SOUDIAN Z.
J.Physiol., London, 1944,103,297
- 7- BARSCUM G.S. et SMIRK F.H.
Clin.Sc., 1936,2,337
- 8- BARSCUM G.S. et SMIRK F.H.
Clin.Sc., 1936,2,353
- 9- BEALL G.N.
Int.Arch.Allergy, 1964,25,249
- 10- BENDA R.
Recherches expérimentales sur l'asthme
Paris, MALCINE Ed. 1950

- 11- BENDA R. et URQUIA D.A.
C.R.Soc.Biol.,Paris, 1948,142,167
- 12- BENDA R. et URQUIA D.A.
Sem.Hôp. Paris, 1949,25,n°56,2695
- 13- BENDA R. et URQUIA D.A.
Bull.Mem.Soc.Méd. Hôp.Paris, 1949,65,n°78,248
- 14- BENDA R. et URQUIA D.A.
Bull.Mem.Soc.Méd.Hôp.Paris, 1955,71,n°1-2,26
- 15- BEZIAN J.H.
Thèse Fac.Med.et Pharm.Bordeaux, 1960
- 16- BOVET D. et STAUB A.M.
C.R.Soc.Biol.Paris, 1937,124,547
- 17- BOYER J.,DEPIERRE F., TISSIER M. et JACOB J.
Presse Méd.,1956,64,1003
- 18- BURTIN-LABORDE C.
Thèse Doct.Sci., Paris 1966
- 19- CERHOVA M. et CERNIK L.
Acta allerg., 1966,21,89
- 20- CODE C.F.
J.Physiol.,London, 1937,81,257
- 21- COHEN M.L. et NIEFORTH K.A.
J.Pharmac.Sc., 1969,58,97
- 22- COHEN Y.
J.Physiol.Paris, 1953,45,86
- 23- COHN E.J., STRONG L.E., HUGUES W.L., MULFORD Jr, ASHWORTH J.N.,
MELIN M. et TAYLOR H.L.
J.Am.Chem.Soc., 1946,68,459
- 24- COURTOIS J-E., HAVEZ R., AGNERAY J. et BISERTE G.
C.R.Acad.Sc.Paris, 1965,260,1926

- 25- CRAPS L. et INDERBITZIN T.
Int.Arch.Allergy, 1957,11,285
- 26- CRUCHAUD A., GIRARD J.P., DOMINE E. et MICHEL H.
Int.Arch.Allergy, 1961,19,65
- 27- DALE H.H. et LAIDLAW P.P.
J.Physiol.,London, 1910,41,318
- 28- DANELATOS C.
Mémoire pour le titre d'assistant étranger
Fac.Méd.Paris 1955
- 29- DEMAILLE J., DAUTREVAUX M., HAVEZ R. et BISERTE G.
Bull.Soc.Chim.France, 1965,12,3506
- 30- DETERMANN H.
Chromatographie sur gel
MASSON et Cie éditeurs 1969
- 31- DEUTSCH H.F., GOSTING L.J., ALBERTY R.A. et WILLIAMS J.W.
J.Biol.Chem., 1946,164,109
- 32- DURAND G.
Mémoire pour le concours de la médaille d'or organisé
par l'Administration générale de l'Assistance Publique
1969
- 33- DWORETZKY M et CODE C.F.
Amer.J.Physiol., 1951,166,462
- 34- FLODIN P.
Dextran gels and their applications in gel filtration
PHARMACIA UPPSALA, Suède 1962
- 35- GADDUM J.M.
Ciba Foundation Symposium on Histamine 285, London,
J.and A. CHURCHILL Ltd 1956
- 36- GELOTTE B., FLODIN P. et KILLANDER J.
Arch.Biochem.Biophys., 1962,Suppl.1, 319

- 37- GESCE A., KARADY S. et WEST G.B.
J.Pharm.Pharmac., 1968, 20, 655
- 38- GRANDADAM J.
Thèse Doct.Vétérinaire, 1956
- 39- GREEN J.P.
Fed.Proceed., 1967, 26, 211
- 40- GUIRGUIS H.M.
Int.Arch.Allergy, 1967, 31, 587
- 41- GUIRGUIS H.M.
J.Allergy, 1969, 43, 255
- 42- HURIEZ C., DESMONS F., AGACHE P., BAELDEN J. et DUQUESNE J.P.
Presse méd. 1964, 72, 909
- 43- HURIEZ C., DESMONS F. et CARTIER J.C.
Bull.Soc.Fr.Dermat.Syph., 1960, 67, 510
- 44- ISHIZAKA K. et ISHIZAKA T
J.Allergy, 1966, 37, 169
- 45- ISHIZAKA T., ISHIZAKA K., JOHANSSON S.G.O. et BENNICHT H.
J.Immunol. 1969, 102, n^o4
- 46- JARDILLIER J.C.
Thèse Doct.Etat Pharm., Paris 1968
- 47- JEUNE M.R., CARRON R., PELLERAT J. et MURAT M.
Sem.Hôp.Paris, 1959, 35, 2867
- 48- KAPLAN E.H. et DAVIS J.
Proc.Soc.Exp.Biol., New York, 1953, 84, 218
- 49- KLAMERTH O.
Biochem.Z., 1955, 327, 62
- 50- LABAT J., LEBEL B., PARROT G., PARROT J.L. et COURTOIS J.E.
C.R.Acad.Sc.Paris, 1966, 263, 2050

- 51- LABORDE C., PARROT J.L. et SANDOR G.
C.R.Acad.Sci.Paris, 1959,248,3069
- 52- LABORDE C., PARROT J.L. et URQUIA D.A.
Presse méd.,1953,61,1151
- 53- LEBEL B.
Thèse à paraître
- 54- LEBRETON P.
Bull.Soc.Chim.France, 1960,11-12,2188
- 55- LEGROUX R.,LEVADITI J.C.,BOUDIN G. et BOVET D.
Presse méd.,1946,54,545
- 56- MIKOL C.,RENOUX M. et MERKLEN F.P.
Bull.Mém.Soc.Méd.Hôp.Paris, 1961,12-13,44
- 57- MOORE D.H.
J.Biol.Chem., 1945,161,21
- 58- NEUGEBAUER K. et SCHMID S.
Wien.inn.Med.Grenzgeb.,1949,30,383
- 59- NIKITINE M.N. et RACHMALEVITCH E.M.
Labo Delo, 1967,n°8,8772
- 60- OH Y.H.,LEITCH W.E.,AXELROD S.,MOUCHLY SMALL S.,WINZLER R.J.
et SANDERS B.E.
Biochem.Pharmacol., 1967,16,849
- 61- OUCHTERLONY O.
Acta Pathol.Microbiol.Scand., 1949,26,507
- 62- PARROT J.L.
C.R.Soc.Biol.,Paris, 1948,142,631
- 63- PARROT J.L.
C.R.Soc.Biol.,Paris, 1949,143,1553
- 64- PARROT J.L.
Actualités Pharmacol., 1958,11,233

- 65- PARROT J.L., FLAVIAN N. et THOUVENOT J.
C.R.Soc.Biol., Paris, 1957,244,2865
- 66- PARROT J.L. et GABE M.
C.R.Soc.Biol., Paris, 1945,139,965
- 67- PARROT J.L., GABE M. et HERRAULT A.
C.R.Soc.Biol., Paris, 1947,141,484
- 68- PARROT J.L., LABORDE C. et LEBEL B.
Rev.Fr.Allerg., 1963,3,1
- 69- PARROT J.L., LABORDE-BURTIN C. et SAINDELLE A.
in ROCHA e SILVA M.
Histamine and antihistaminics
Handbook of Experimental pharmacology, 1966,XVIII,1,162-178
SPRINGER-VERLAG
- 70- PARROT J.L., LEBEL B., COURTOIS J.E., AGNERAY J., DURAND G. et
FEGER J.
C.R.Acad.Sc.,Paris, 1969,268,2536
- 71- PARROT J.L. et MORDELET-DAMBRINE M.
Arch.Int.Pharmacol.Ther., 1961,130,425
- 72- PARROT J.L. et MORDELET-DAMBRINE M.
J.Physiol., Paris, 1961,53,439
- 73- PARROT J.L. et MORDELET-DAMBRINE M.
J.Physiol.,Paris, 1962,54,579
- 74- PARROT J.L., URQUIA D.A. et LABORDE C.
C.R.Soc.Biol.,Paris, 1951,145,885
- 75- PARROT J.L., URQUIA D.A. et LABORDE C.
C.R.Soc.Biol., Paris, 1951,145,1045
- 76- PARROT J.L., URQUIA D.A. et LABORDE C.
C.R.Soc.Biol., Paris, 1952,146,1052

- 77- PATON W.D.M.
Brit.J.Pharmacol., 1951,6,499
- 78- PAUPE J.
in Journées parisiennes de pédiatrie, 1968
Editions médicales FLAMMARION
- 79- PAUTRIZEL R.,RIVASSEAU A.,BEZIAN J. et SZERSNOVICZ F.,
Ann.Biol.Clin., 1960,18,661
- 80- PELLERAT J.,MURAT J.M. et RIVES H.
Bull.Soc.Fr.Dermat.Syph.,1957,64,450
- 81- PENNEL R.B.
In PUTNAM F.W.
The Plasma Proteins, 1960,1,9-50,ACADEMIC PRESS N.Y.and
London
- 82- PORTER J.F. et SMITH S.
Acta allergol.,1969,24,253
- 83- RILEY J.F. et WEST G.B.
J.Physiol., London, 1953,120,528
- 84- SCHAYER R.W. et COOPER J.A.D.
J.Appl.Physiol., 1956,9,481
- 85- SCHEN R.J. et RABINOVITZ M.
Clin.Chim.Acta, 1966,13,4537
- 86- SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F.
Molecular biology of human proteins, 1966,1,24
ELSEVIER éd.
- 87- SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F.
Molecular biology of human proteins, 1966,1,250
ELSEVIER éd.
- 88- SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F.
Molecular biology of human proteins,1966,1,422-427
ELSEVIER éd.
- 89- SCOPES R.K.
Nature. 1963.197.1201

- 90- SHORE P.A., BURKHALTER A. et COHN V.H.
J.Pharmacol.Exp.Ther., 1959,127,182
- 91- SICILIANO A.A. et NIEFORTH K.A.
Arzneimittel Forsch., 1968,18,764
- 92- SVENSSON H.
Arch.Biochem.Biophys., 1962,Suppl.1, 132
- 93- TABOR M. et MOSETTIG F.
J.Biol.Chem., 1949,180,703
- 94- UVNAS B
Fed.Proceed., 1967,26,219
- 95- VAN DEN HALER C.J.A., BUYZE G. et VAN DER HEYDEN M.C.M.
Prot.Biol.Fluids, 1964,382, ELSEVIER
- 96- VESTERBERG O.
Science Tools, 1969,16,nº2
- 97- WALLENFELS K., KERP L. et SUND H.
Klin.Wschr., 1958,36,772
- 98- WHITAKER J.R.
Anal.Chem., 1963,35,1950

o o

()

T A B L E d e s M A T I E R E S

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PREMIERE PARTIE</u> - <u>ETUDE THEORIQUE</u>	4
<u>CHAPITRE I</u> - Histamine d'origine exogène	5
A/ Origine	5
B/ Catabolisme	5
C/ Captation par la mucine	6
<u>CHAPITRE II</u> - Histamine d'origine endogène	9
A/ Biosynthèse	9
B/ Localisation intracellulaire	10
C/ Catabolisme	12
<u>CHAPITRE III</u> - Méthodes d'étude de l'histaminopexie sérique	17
I- Etude du pouvoir de captation de l'histamine par un sérum humain normal	17
A/ Technique physiologique	17
B/ Technique pharmacodynamique	18
C/ Equilibre de dialyse	20
D/ Ultracentrifugation	21
E/ Ultrafiltration	22
F/ Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex	22
G/ Séroagglutination	23

II- Etude des caractéristiques physico-chimiques du facteur histaminopexique	24
A/ Identification de ce facteur à une globuline	24
B/ Etude par chromatographie de filtra- tion sur gel de Sephadex G 200 et sur échangeurs d'anions	26

DEUXIEME PARTIE - TECHNIQUES UTILISEES 28

<u>CHAPITRE I</u> - Fractionnement par l'éthanol	29
<u>CHAPITRE II</u> - Préparation d'un extrait phytique	31
<u>CHAPITRE III</u> - Relargage par le sulfate d'ammo- nium	33
<u>CHAPITRE IV</u> - Chromatographie sur gel polymérisé hydrophile	35
<u>CHAPITRE V</u> - Electrophorèse de zone en gradient de densité	42
<u>CHAPITRE VI</u> - Electrofocalisation	51
<u>CHAPITRE VII</u> - Modalité de l'étude pharmacologique	60

TROISIEME PARTIE - ETUDE EXPERIMENTALE SERUM HUMAIN

<u>INTRODUCTION</u>	66
<u>CHAPITRE I</u> - Fractionnement selon la méthode de Cohn	69
<u>CHAPITRE II</u> - Fractionnement d'un sérum humain normal par l'acide phytique	72
<u>CHAPITRE III</u> - Relargage par le sulfate d'ammonium	
I- Relargage d'un mélange de sérums humains normaux	75
II- Relargage de 90ml de sérum humain normal ...	77
III- Relargage par le sulfate d'ammonium à demi- saturation de sérums humains normaux et de sujets allergiques	81
IV- Mise en évidence de la libération d'histamine en cours de relargage	82

<u>CHAPITRE IV</u> - Application successive des trois techniques de fractionnement	86
<u>CHAPITRE V</u> - Chromatographie sur gel de Sephadex G 200	89
I- Chromatographie d'un sérum humain normal	89
II- Chromatographie de 10ml de sérum humain normal	90
III- Chromatographie des fractions actives de relargage par le sulfate d'ammonium	92
IV- Chromatographie d'un extrait phytique de sérum humain normal	95
V- Chromatographie d'un extrait phytique des fractions I - II - III de Cohn	98
VI- Bilan	99
<u>CHAPITRE VI</u> - Electrophorèse de zone en gradient de densité	102
I- Electrophorèse d'un sérum humain normal	103
II- Electrophorèse de la fraction active obtenue sur gel de Sephadex G 200	105
III- Bilan	108
<u>CHAPITRE VII</u> - Electrofocalisation	109
<u>CHAPITRE VIII</u> - Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 25 et sur Biogel P 10	115
<u>CHAPITRE IX</u> - Discussion des résultats	124
<u>- ETUDE EXPERIMENTALE SERUM DE PORC</u>	128
<u>INTRODUCTION</u>	129
<u>CHAPITRE X</u> - Etude des protéines du sérum de porc	
I- Comportement électrophorétique	130
II- Précipitation par le sulfate d'ammonium et par l'acide phytique	133
III- Chromatographie de filtration sur gel de Sephadex G 200	136

<u>CHAPITRE XI</u> - Isolement à partir du sérum de porc du facteur capable de diminuer l'activité biologique de l'hista- mine sur l'iléon isolé de cobaye ...	139
I- Relargage par le sulfate d'ammonium	139
II- Double précipitation par le sulfate d'ammonium ..	140
III- Chromatographie de filtration sur Sephadex G 200 d'un extrait phytique de sérum de porc	141
IV- Séparation par électrophorèse de zone en gradient de densité	144
V- Electrofocalisation	145
VI- Etude des caractères physico-chimiques du facteur isolé du sérum de porc et capable de diminuer l'activité biologique de l'histamine sur l'iléon isolé de cobaye	149
<u>CHAPITRE XII</u> - CONCLUSIONS GENERALES	151
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	153

o o

0

LEGENDES DES FIGURES

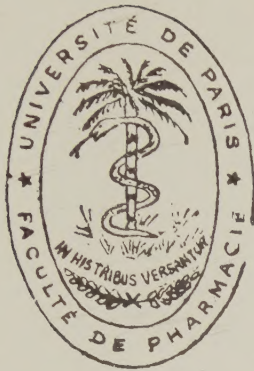
Figure 1	: Variations de V_e en fonction de M	38
2	: Electrophorèse de zone en gradient de densité	43
3	: Systèmes générateurs de gradients de densité	46
4a	: Pente d'un gradient de saccharose obtenu avec le système à volume constant	49
4b	: Pente d'un gradient de saccharose obtenu avec le système à intervention retardée	49
5	: Focalisation des protéines à leur point isoélectrique	52
6	: Electrofocalisation	55
7	: Variation de la conductance en fonction du pH	58
8	: Variation de l'absorbance d'un mélange d'Ampholine pH 4-6 en fonction du pH	58
9	: Test pharmacologique sur l'iléon de Cobaye ..	63
10	: Détermination de l'unité d'activité	63
11	: Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique des fractions I, II, IV de COHN ..	71
12	: Fraction active précipitée par le sulfate d'ammonium entre 2,5 M et 2,8 M à pH 7,0	78
13	: Chromatographie sur gel de Sephadex G 200 d'un sérum humain normal	91
14	: Chromatographie sur gel de Sephadex G 200 de la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium entre 2,5 M et 2,8 M à pH 7,0	94
15	: Etude immunoélectrophorétique des fractions actives de chromatographie sur gel de Sephadex G 200 d'un extrait phytique et d'une fraction active de relargage par le sulfate d'ammonium d'un sérum humain normal	96

Figure 16	: Electrophorèse de zone en gradient de densité	107
17	: Electrofocalisation de la fraction active obtenue par électrophorèse en gradient de densité (sérum humain)	111
18	: Chromatographie sur gel de Sephadex G 25	112
19	: Influence du temps et de la température sur le pour- centage d'histamine fixée	120
20	: Chromatographie sur BIOGEL P 10 du mélange ¹⁴ C. Protéine après incubation de 12 heures à +37°C	120
21	: Electrophorèse sur papier à pH 8,6	131
22	: Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH 3,9 ..	131
23	: Electrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,6 ..	132
24	: Electrophorèse sur gel d'agarose à pH 8,2	134
25	: Chromatographie sur gel de Sephadex G 200 d'un sérum de Porc	138
26	: Chromatographie sur gel de Sephadex G 200 d'un extrait phytique de sérum de Porc	143
27	: Electrophorèse de zone en gradient de densité de la fraction active obtenue par chromatographie sur Sephadex G 200	146
28	: Electrofocalisation de la fraction active obtenue par électrophorèse en gradient de densité (sérum de Porc)	148

LEGENDES DES TABLEAUX

TABLEAU I	: Catabolisme de l'histamine	13
II	: Types de BIOGEL disponibles	41
III	: Activité comparée d'un sérum et de son extrait phytique	73
IV	: Activité comparée de deux sérums et de leurs fractions de relargage	79
V	: Activité comparée d'une fraction de relargage avant et après incubation avec l'histamine	82
VI	: Intérêt de l'application successive des trois techniques de précipitation	88
VII	: Activité comparée d'un sérum et de la fraction préalbuminique obtenue par élec- trophorèse en gradient de densité	105
VIII	: Influence du temps et de la température sur le pourcentage d'histamine fixée ...	119
IX	: Plan de fractionnement	125

Vu et permis d'imprimer -
Paris le 29 juin 1970.



[Handwritten signature]

Le doyen
P. MALANGEAU.

